

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Účinky a molekulární změny vyvolané působením nových taxanů
v experimentálních modelech a u pacientů se solidními nádory**

*The effects of a molecular change caused by new taxanes in experimental models
and patients with solid tumors*

Bc. Kamila Koucká

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Radka Václavíková, PhD.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a Mgr. Radky Václavíkové, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....
Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. a Mgr. Radce Václavíkové, PhD., za skvělé odborné vedení, cenné rady a připomínky. Děkuji také doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc., za pomoc, kterou mi poskytoval při psaní této práce. Děkuji Ing. Marii Ehrlichové za věnovaný čas a rady, které mi poskytla při práci s tkáňovými kulturami. Děkuji celému Oddělení toxikogenomiky SZÚ za laskavý přístup, všestrannou pomoc a možnost vypracování této práce.

V neposlední řadě patří velký dík mé rodině a blízkým za neutuchající podporu.

Abstrakt

Karcinom ovaríí je nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické malignity. K jeho léčbě se nejčastěji využívají taxany a platinové deriváty. Vážnou komplikací v léčbě je rozvoj mnohočetné lékové rezistence vůči použité chemoterapii. Proto jsou hledána nová chemoterapeutika a terapeutické cíle, které by byly schopné rezistenci nádorových buněk překonat.

Hlavními cíli předkládané diplomové práce bylo i) studium účinnosti nových derivátů konvenčních taxanů v rezistentních nádorových ovariálních buňkách *in vitro* s cílem vybrat potenciálně nejúčinnější taxanové deriváty pro další studie, ii) analýza genového expresního profilu signální dráhy Notch, která se jeví jako možný terapeutický cíl při léčbě karcinomu ovaríí. Konkrétně byly v diplomové práci hledány vztahy mezi hladinami genové exprese signální dráhy Notch u pacientek s ovariálním karcinomem a jejich prognózou, progresí a přežíváním.

V předkládané diplomové práci byly na základě účinnosti *in vitro* vybrány nejvhodnější kandidáti nových taxanových derivátů (Stony Brook taxany – „SB-T“; SB-T-121402, SB-T-121605, SB-T-121606), které jsou velmi účinné v NCI/ADR-RES nádorových buňkách karcinomu ovaria rezistentních vůči konvenčnímu taxanu paclitaxelu. Ve studii významu signální dráhy Notch u pacientek s karcinomem ovaria byla pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase sledována genová exprese hlavních zástupců signální dráhy Notch a jejích cílových genů. Byly nalezeny významné změny v expresi této dráhy při porovnání nádorové a kontrolní ovariální tkáně. Dále byl zjištěn vztah mezi hladinami exprese sedmi genů a agresivitou ovariálního nádoru a nalezena souvislost exprese genu NOTCH3 s přežíváním pacientek s ovariálním nádorem.

Nové deriváty taxanů se jeví jako velmi účinné v rezistentních nádorových buňkách a mohly by hrát významnou roli v léčbě karcinomu ovaríí, kde je rezistence závažným problémem úspěšné léčby. Rovněž signální dráha Notch se jeví jako potenciální terapeutický cíl, který by mohl pomoci v individualizované terapii ovariálních nádorů.

Klíčová slova: taxany, ovariální karcinom, signální dráha Notch

Abstract

Ovarian cancer is the most common cause of death from gynecological malignancy. Taxanes and platinum derivatives are most used therapeutics for its treatment. Development of multi drug resistance to chemotherapy represents a serious complication of the treatment. Therefore, new chemotherapeutic and therapeutic targets are investigated, which could help to overcome tumor cell resistance.

The main objectives of the thesis were to study: i) the efficiency of new derivatives of conventional taxanes *in vitro* with the aim to determine the potentially most effective taxane derivatives in resistant tumor ovarian cells and, ii) the gene expression profile of the Notch signaling pathway, as a possible therapeutic target for the treatment of ovarian cancer. Specifically, the thesis focused on the relationship between levels of Notch signaling gene expression in patients with ovarian carcinoma and their prognosis, progression and survival.

This thesis revealed that Stony Brook Taxanes – „SB-T“; SB-T-121402, SB-T-121605, and SB-T-121606 derivatives are very effective in NCI/ADR-RES tumor carcinoma cells resistant to conventional taxane – paclitaxel, and should be further studied in more advanced models, e.g. *in vivo* patient derived xenografts.

In a study of the importance of the Notch signaling pathway in ovarian cancer patients, a gene expression of the major representatives of the Notch signaling pathway and its target genes were monitored by real-time polymerase chain reaction. Significant changes in this pathway were observed in tumor compared to control ovarian tissues. In addition, the relationship between expression levels of seven genes with the most aggressive ovarian cancer HGSC subtype and the association of NOTCH3 gene expression with the survival of ovarian cancer patients were found.

In conclusion, new taxane derivatives are very effective in resistant tumor cells and could play an important role in the treatment of ovarian carcinoma, where resistance is a serious problem for successful treatment. The Notch signaling pathway appears to be a potential prognostic biomarker and therapeutic target that could help in individualized ovarian cancer therapy.

„(In Czech)“

Key words: taxanes, ovarian cancer, Notch signaling pathway

Obsah

1	Úvod a přehled literatury	1
1.1	Nádorová onemocnění	1
1.1.1	Vznik a rozvoj nádorových onemocnění	2
1.1.2	Možnosti terapie nádorových onemocnění	3
1.2	Zhoubné nádory vaječníků	5
1.2.1	Diagnostika a klasifikace nádorů vaječníků	7
1.2.2	Terapie nádorů vaječníků	9
1.3	Taxany	10
1.3.1	Mechanismus účinku taxanů	10
1.3.2	Metabolismus taxanů	11
1.4	Mnohočetná léková rezistence	12
1.5	Možnosti překonání MDR vůči taxanům	15
1.5.1	Nové deriváty taxanů	15
1.5.2	Signální dráha Notch jako terapeutický cíl	17
2	Cíle práce	21
3	Materiál a metody	22
3.1	Použité chemikálie	22
3.2	Použité přístroje	23
3.3	Metody použité v části studie <i>in vitro</i>	24
3.3.1	Práce s buněčnými kulturami a jejich charakterizace	26
3.3.2	Stanovení cytotoxicity taxanů pomocí xCELLigence RTCA DP	27
3.3.3	Průtoková cytometrie	28
3.4	Metody použité při práci s klinickými vzorky pacientek	29
3.4.1	Vzorky a informovaný souhlas pacientek	29
3.4.2	Izolace nukleových kyselin a proteinu	30
3.4.3	Měření koncentrace a kvality RNA	30
3.4.4	Syntéza cDNA	30
3.4.5	Amplifikace cDNA a horizontální agarosová elektroforéza	31

3.4.6 Stanovení genové exprese pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase.....	33
3.4.7 Statistické vyhodnocení polymerázové řetězové reakce v reálném čase.....	36
3.4.8 Statistické hodnocení genové exprese v souvislosti s klinicko-patologickými daty pacientek	37
4 Výsledky.....	38
4.1 Výsledky části studie <i>in vitro</i>	38
4.1.1 Cytotoxicita paclitaxelu a nových taxanů stanovená pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP	38
4.1.2 Vliv paclitaxelu a nových taxanů na buněčný cyklus v rezistentních nádorových buňkách vaječníků	40
4.2 Studie zabývající se významem signální dráhy Notch u klinických vzorků pacientek s nádory vaječníků	48
4.2.1 Základní charakteristiky sledovaného souboru pacientek.....	48
4.2.2 Stanovení genové exprese signální dráhy Notch.....	51
4.2.3 Porovnání genové exprese v primárních nádorech a kontrolní tkáni vaječníků	52
4.2.4 Souvislost genové exprese s klinicko-patologickými daty pacientek s nádory vaječníků	53
4.2.5 Korelace genové exprese s přežíváním pacientek s nádory vaječníků	57
5 Diskuze	59
5.1 Část studie <i>in vitro</i>	59
5.2 Studie signální dráhy Notch u pacientek s nádory vaječníků	62
6 Souhrn.....	65
7 Seznam literatury.....	67
Přílohy	76
Příloha I	76
Příloha II.....	79
Příloha III	82
Příloha IV	84
Příloha V.....	85

Seznam použitých zkratk

ABC – „ATP binding cassette“

AR – androgenní receptor

ATP/ADP – adenosin-tri/di-fosfát

Bcl – „B-cell lymphoma“

CA – „Cancer antigen“

CD – „cluster of differentiation“

CSL – „CBF1, Suppressor of hairless, Longevity assurance gene 1“

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DSL – „Delta, Serrate, Lag 2“

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EGF – „Epidermal growth factor“

FBS – „Fetal bovine serum“

FIGO – „International federation of gynecology and obstetrics“

HE4 – „Human epididymis protein 4“

HEPES – „4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid“

HES – „The – „hairy enhancer of split“

HGSC – „High grade serous carcinoma“

IC₅₀ – koncentrace způsobující 50% maximální inhibici

LGSC – „Low grade serous carcinoma“

LRP – „Lung resistance - related protein“

MAML – „Mastermind-like protein“

MDR – „Multi Drug Resistance“

NECD – „Notch extracellular domain“

NICD – „Notch intracellular domain“

NMR – nukleární magnetická rezonance

P-gp – P-glykoprotein

PARP – poly-ADP-riboso-polymerasa

PBS – „Phosphate buffered saline“

PSA – prostatický specifický antigen

SB-T – Stony Brook Taxany

SKIP – „Ski-interacting protein“

SPSS – „Statistical package for the social sciences“

STR – „Short tandem repeat“

SZÚ – Státní zdravotní ústav

TACE – „Tumor necrosis factor α converting enzyme“

TBE – tris-borát-EDTA

TNM – „Tumor-node-metastasis“

VEGF – „Vascular endothelial growth factor“

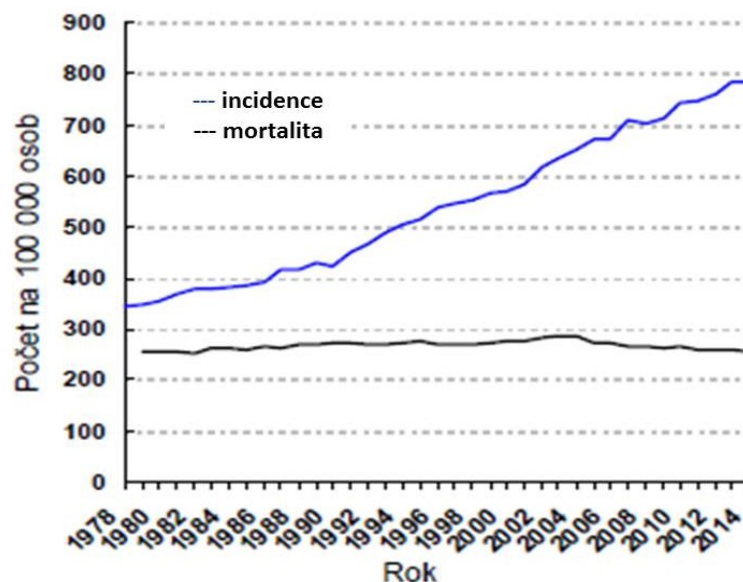
1 Úvod a přehled literatury

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou společně se srdečními chorobami nejčastější příčinou úmrtí na území České republiky. Podle dostupných dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR tvoří 25 % všech úmrtí právě onkologičtí pacienti. [1] Na vzniku nádorů se podílí celá řada vnitřních faktorů jako je genetická výbava či funkce imunitního systému člověka, tak vnějších faktorů (nevhodná strava, stres a také působení celé řady dalších látek jako jsou chemické karcinogeny přítomné v životním prostředí, např. ve vodě, vzduchu apod.). [2, 3]

Celková incidence nádorových onemocnění setrvale roste, naopak mortalita mírně klesá. Za rok 2014 dosáhla incidence zhoubných novotvarů v ČR hodnoty 82 505 nově diagnostikovaných onemocnění, z toho zemřelo 27 050 lidí. To je celkem 784 diagnostikovaných onemocnění a 257 úmrtí na 100 000 obyvatel, jak je ilustrováno na Obr. 1. [4]

Mezi nejčastější nádorová onemocnění patří celosvětově nádory prsu, prostaty, plic, tlustého střeva a konečníku, a děložního hrdla. U žen je nejčastějším typem maligního onemocnění karcinom prsu, u mužů je to karcinom plic. [5]



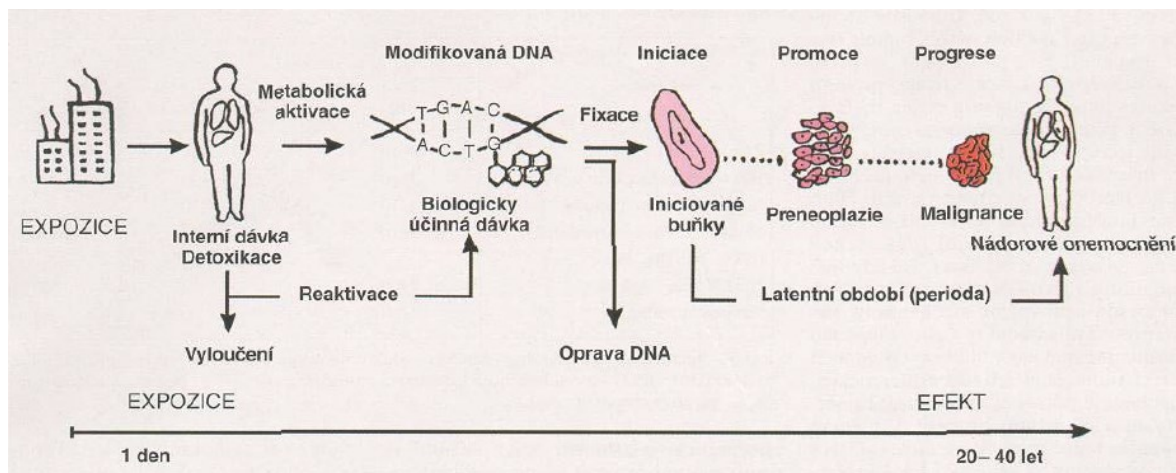
Obr. 1 Incidence nádorových onemocnění a mortalita na 100 000 osob v letech 1978 – 2014 v ČR, převzato z [4]

1.1.1 Vznik a rozvoj nádorových onemocnění

Nádorové onemocnění charakterizujeme jako neregulovaný růst buněk s autonomní povahou buněčné proliferace, který je spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciaci. [6] Tkáň, která abnormálně roste a poškozuje organismus je označována jako nádor (karcinom) neboli tumor či novotvar. [7, 2] Rostoucí nádor přitom může potlačovat okolní struktury, a/nebo vést k postupné invazi do okolních struktur a systémů a k metastazování. [6]

Celý proces, kterým ke vzniku a rozvoji nádorů dochází, je pak označován jako *karcinogeneze*. Hlavní podstatu karcinogeneze představují nevratné změny na molekulární úrovni, které vedou k chybám v regulačních procesech, dále ztrátě diferenciaci a nekontrolovatelnému dělení buněk. Dochází k poruchám v genech, které se podílejí zejména na regulaci buněčného dělení a mezi tyto geny patří protoonkogeny a tumorové supresorové geny. [7, 2] Jako protoonkogeny jsou označovány geny, které se podílejí na regulaci transkripce, posttranskripčních úpravách, translaci a jejích úpravách. Vedle toho působí tumor supresorové geny (jejich proteiny) jako potlačující prvky proliferace. Na vzniku nádoru se neodmyslitelně podílejí i faktory zevního prostředí, které lze dle jejich povahy rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Mezi hlavní fyzikální faktory, které iniciují vznik nádoru, řadíme radioaktivní, ultrafialové, ionizující a také Roentgenovo záření a celou řadu faktorů chemických. [2] Mezi chemické faktory zahrnujeme působení polycyklických aromatických uhlovodíků (např. benzo[a]pyren), jejichž zdrojem je zejména tabákový kouř a průmyslové výpary. Dalšími chemickými faktory jsou aromatické aminy (např. benzidin), azbest a aflatoxiny z různých plísní. Mechanismem působení je většinou jejich kovalentní vazba na molekulu DNA nebo mohou působit nepřímo např. prostřednictvím kyslíkových radikálů, které vznikají jejich vlivem. [8] Konečně mezi biologické faktory vzniku nádorového onemocnění patří hlavně působení DNA- a RNA-virů, dále hepadnavirů a papilomavirů. [8, 6]

Proces karcinogeneze probíhá v několika relativně dobře charakterizovaných fázích; iniciace, promoce a progrese; tyto fáze jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2 Schéma víceetapového procesu karcinogeneze, převzato z [2]

K iniciaci buňky může dojít chybnou nebo nefunkční opravou mutace, která aktivuje onkogen nebo deaktivuje tumor supresor. V případě, že buňka není odstraněna imunitním systémem, může se později vyvinout v nádorovou.

V promoční fázi dochází k nárůstu iniciovaných buněk. Důležitou roli v této fázi hrají proteinkinasy a fosfatasy a jejich regulace, dále produkty onkogenů, které jsou uvolňovány po aktivaci onkogenním virem nebo změny DNA způsobené kyslíkovými radikály. Vzniká tak benigní (nezhoubný) nádor.

Fázi progrese lze přirovnat k iniciační, procesy jsou však mnohem výraznější. V této fázi dochází ke vzniku maligního nádoru (zhoubného), který infiltruje krví nebo lymfou do jiných tkání, kde se mohou dále rozmnožovat a vytvářet tak dceřiné nádory – metastázy. [2]

1.1.2 Možnosti terapie nádorových onemocnění

K terapii nádorových onemocnění se využívá komplexního *přístupu kombinujícího chirurgickou léčbu s radioterapií a užíváním chemoterapeutik*.

Chirurgický zákrok představuje zásadní část léčby, při které dochází k odstranění primárního nádorového ložiska a zabrání se tak komplikacím bezprostředně ohrožujícím život nemocného. Pokud dojde k úplnému vyjmutí nádoru, tím lepší je samotné vyléčení, ovšem ne vždy lze nádor odstranit celý. [9, 6] Z moderních chirurgických přístupů

se v současnosti používají tzv. termoablační metody, kdy je solidní nádor víceméně zničen vysokou teplotou (přes 60 °C) nebo naopak zmrazen teplotami hluboce pod bod mrazu (-70 °C a méně). Technika používající k odstranění nežádoucí tkáně jejího zmrazení se nazývá kryochirurgie. [10] V porovnání s klasickou chirurgií je výhodnější tím, že je méně invazivní, nákladná a doba rekonvalescence pro pacienta je kratší. Ovšem na druhou stranu bylo zjištěno, že samotné zmrazení nemůže úplně zničit nádorovou tkáň, neboť je při zákroku ochlazována také okolní zdravá tkáň a může tak být poškozena. S ohledem na zdravou tkáň nebývá zmrazení využito v plném možném rozsahu a využívá se zejména pro lokalizované nádory kůže či dolní části konečníku a do velikosti ložiska maximálně 5 cm. [11, 10]

Radioterapeutickou léčbu, využívající k léčbě nádorů letálních účinků ionizujícího záření, podstupuje zhruba polovina nemocných. Radioterapie může být aplikována samostatně nebo v kombinaci s ostatními metodami, zejména chemoterapií. Cílem radioterapie je zničit nádor a co nejméně poškodit okolní zdravou tkáň. V radioterapii je využíváno gama záření nebo záření X, dále je možné aplikovat záření korpuskulární (částicové). Záření je možné aplikovat ze vzdálenosti několika desítek centimetrů od nemocného, nebo je zdroj záření zaveden přímo do centra nádoru a ten je tak ozařován zevnitř, tato léčba se nazývá brachyterapie. [12]

Nedílnou součástí léčby nádorových onemocnění je i **chemoterapie**, která také někdy bývá označována jako farmakoterapie. Jedná se o léčbu pomocí léků, které se označují jako protinádorová léčiva neboli cytostatika (chemoterapeutika). Zpravidla se při léčbě používá kombinace různých cytostatik vzhledem k různým mechanismům účinku, kterými cytostatika působí, jako je přímé poškození nukleových kyselin, inhibice klíčových enzymů metabolismu, alterace mikrotubulárního systému, porucha syntézy proteinů či poškození buněčné membrány. [13] Chemoterapie může být adjuvantní nebo neadjuvantní. V případě adjuvantní léčby se chemoterapie používá jako doplňující léčba k chirurgickému zákroku či ozařování. Neoadjuvantní léčba je využívána ještě před samotným chirurgickým zákrokem či ozařováním, slouží ke zmenšení nádoru a zlepšení operability. Chemoterapie bývá využívána i jako udržovací neboli paliativní terapie. [6] Pro organismus člověka je léčba cytostatiky vždy toxická. Dochází k ovlivnění nejen nádorových, ale i buněk těla vlastních. Cytostatická léčba je tak doprovázena celou řadou závažných nežádoucích účinků např.: alopecie, kardiotoxicita, nefrotoxicita, neurotoxicita, toxicita gastrointestinálního traktu či výrazné snížení imunity. [14, 15, 16, 17, 18, 19]

Hormonálně podmíněná nádorová onemocnění (prostata, děložní sliznice, mléčná žláza), mohou být léčeny **hormonální terapií**. V nádorové buňce jsou přítomné receptory, které se pojí s hormonem, a následně může dojít k buněčné proliferaci. V oblasti hormonální terapie jsou velmi využívány inhibitory syntézy hormonu, např. inhibitory aromatasy, gestageny, antagonisté gonadoliberinu. Další možností je blokáce účinku již vzniklých hormonů, sem řadíme antiandrogeny a antiestrogeny. [20, 21]

Mezi nové způsoby léčby pak řadíme např. **cílenou (dříve biologickou) léčbu**. Cílená léčba si klade za cíl působit pouze lokálně, v místě nádoru, a zamezit proliferaci nádorových buněk přirozenější cestou. Za jeden z vlivných faktorů proliferace je považována angiogeneze. Její inhibice může vést až k potlačení růstu nádoru. Hlavní roli v procesu angiogeneze má signální osa VEGF („vascular endothelial growth factor“) a její receptory. Na tuto osu cílí rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka, léčivo označované jako Avastin. Ovlivněním této osy došlo k pokroku také v léčbě nádorů vaječníků. Dalšími látkami, které se v rámci cílené léčby začaly používat, jsou inhibitory PARP (poly-ADP-riboso-polymerasa). PARP patří do skupiny proteinů podílejících se na opravě poškozené DNA. [22, 23] Léčivo s názvem Olaparib (podávané perorálně) je silný inhibitor PARP. U rakoviny vaječníků byly nalezeny dva geny, u kterých přítomnost mutace stojí za dědičností vzniku tohoto onemocnění – *BRCA1* a *BRCA2*. Olaparib je výhradně cytotoxický pronádorové buňky s mutacemi *BRCA1* nebo *BRCA2* genu, zatímco pro buňky bez poškození produktů těchto genů, inhibitory PARP účinné nejsou. [24]

Dalším preparátem využívaným k léčbě maligního nádoru vaječníků je Removab, což je monoklonální protilátka zaměřena proti epitelovým buňkám a proti antigenu CD3 („cluster of differentiation“) T-lymfocytů. [22, 23]

V předkládané diplomové práci jsem se věnovala studiu léčebných možností nádorů vaječníků, kterým je věnována i následující kapitola.

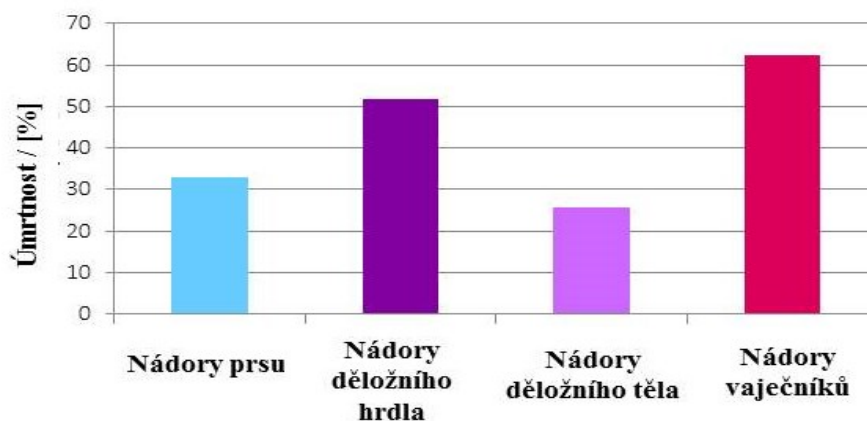
1.2 Zhoubné nádory vaječníků

Nádory vaječníků (ovarií) tvoří 15% všech ženských malignit. [23, 6]

Ve většině případů se jedná o karcinomy povrchového epitelu, ve zbylých případech se jedná o nádory zárodečných buněk nebo jiné. Zhoubné nádory vaječníků se rozvíjejí pomalu, ale mají velký sklon ke tvorbě metastáz. Prostřednictvím lymfatického systému může nádorová buňka „doputovat“ i do vzdálených uzlin (mediastinálních, pánevních, pa-

raaortálních). Vyskytují se metastázy i v oblasti plic a jater, které jsou častější u nediferenciovaných nádorů a u nádorů neepitelového původu. [6]

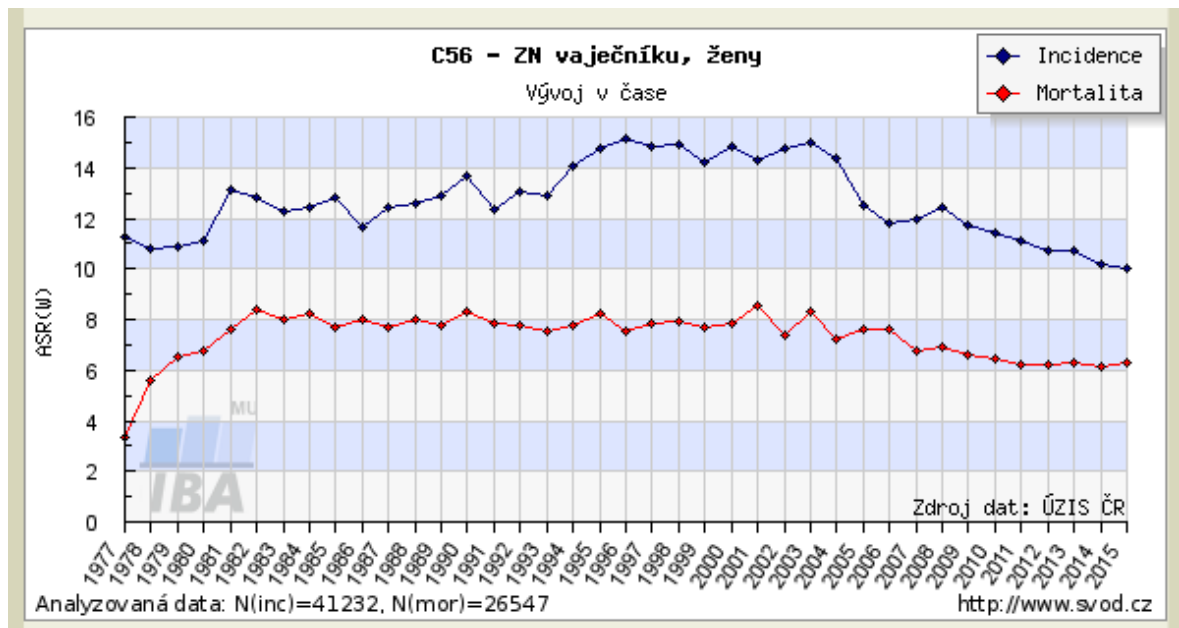
Nádory vaječníků mají mezi gynekologickými nádory největší úmrtnost, jak ukazuje Obr. 3.



Obr. 3 Celosvětová úmrtnost pacientek s gynekologickými nádory pro rok 2015, převzato a upraveno dle [25]

Tato skutečnost je především dána tím, že u většiny pacientek s ovariálním karcinomem se nevyskytují žádné potíže a brzké příznaky tohoto onemocnění. Neexistuje rovněž žádný spolehlivý biomarker, který by usnadnil efektivní „skrínink“ tohoto onemocnění. Z tohoto důvodu je onemocnění, u dvou třetin pacientek, diagnostikováno až v pokročilém stadiu III nebo IV, což značně ovlivňuje možnosti léčby i prognózu tohoto onemocnění. [23, 26, 6]

Výskyt nádorů vaječníků je nejvyšší v Americe, západní Evropě a Izraeli. Naopak nejnižší počet případů je zaznamenán v Japonsku a rozvojových zemích. Mezi ženami v Americe je pak nádorové onemocnění vaječníků pátou nejčastější malignitou. [26] U žen v České republice byl výskyt karcinomu vaječníků v roce 2015 na 8. místě. [3] Incidenci a mortalitu v České republice dokládá Obr. 4 na str. 7. Jak je vidět, incidence nádorů vaječníků má dlouhodobě klesající tendenci, ovšem úmrtnost v posledních 30 letech prakticky stagnuje. Nejvyšší výskyt těchto nádorů je přitom u žen okolo 60. roku věku. [27, 28]



Obr. 4 Časový vývoj incidence a mortality nádorů vaječníků v České republice z let 1977-2015. Na ose x jsou uvedené roky, na ose y je uveden počet případů na 100 000 žen. Převzato z [28]

1.2.1 Diagnostika a klasifikace nádorů vaječníků

Stanovit diagnózu u tohoto onemocnění je velmi obtížné. V první řadě je to dané anatomickým výskytem vaječníků a také tím, že v současné době se nevyskytuje žádná přímá a jednoduchá „skrininková“ metoda, a v řadě druhé – velmi málo žen absolvuje pravidelné lékařské prohlídky, ačkoliv se prevence zlepšuje. Oba tyto důvody vedou k tomu, že k identifikaci nádoru dochází až v pokročilém stádiu onemocnění. Pro diagnostiku se pak nejvíce používá ultrazvukové vyšetření, také stanovení markeru CA-125 („cancer antigen“) v krvi, které může souviset s tímto typem nádoru, i když specifita není příliš velká. [6] Hodnota markeru CA-125 může být zvýšena i při jiných typech nádorů, jako jsou nádory děložní sliznice, benigní cysty vaječníků či myomy. Dále se také může jednat o jiné epiteliální nádory, např. nádory plic. Vysoké sérové koncentrace CA-125 mohou souviset i s jiným typem onemocnění (selhání jater nebo ledvin). Dalším markerem využívaným v poslední době je HE4 („human epididymis protein 4“). Často je více exprimován právě nádorovými buňkami vaječníků, ovšem exprimován je i nádorovými buňkami plic, prsu a gastrointestinálního traktu. Výsledky studií poukazují, že tento marker je stejně citlivý jako marker CA-125 v rámci nádorů vaječníků, ovšem diagnosticky ještě méně přesný. [29]

Přesná diagnóza typu nádoru vaječníku se tedy určuje až z histologického vyšetření tkáně, která se odebere při operaci. Nádory vaječníků lze rozdělit podle buněčného původu na dva základní typy; epiteliální a neepiteliální. S ohledem na histologické informace a klinický obraz se epiteliální nádory vaječníků dále rozdělují do následujících kategorií:

- serózní
- mucinózní
- endometroidní
- mesonefroidní („clear cell“)
- nediferenciované
- neklasifikované
- Brennerovy
- smíšené zhoubné nádory.

Serózní typ epiteliálních ovariálních nádorů je nejčastějším, zaujímá až 80 %. [26, 30] Tyto serózní ovariální nádory můžeme dále rozdělit na málo diferencované „high grade“ (HGSC) a dobře diferencované „low grade“ (LGSC), které se liší svou prognózou; LGSC mají obecně lepší prognózu než málo diferencované nádory vaječníků, které jsou z hlediska úmrtí nejčastějším typem ovariálních nádorů. [31]

Kromě histopatologického typu se u nádorů vaječníků hodnotí i stupeň diferenciaci neboli grade, stadium, eventuálně exprese proliferačního markeru Ki67.

Anatomický rozsah onemocnění se hodnotí jako tzv. stadium FIGO, dle federace „International federation of gynecology and obstetrics“, a to na základě klasifikace TNM („tumor-node-metastasis“).

Klasifikace TNM je systém hodnotící na základě tří částí. T je označení pro primární nádor a jeho rozsah, N je označení pro přítomnost či nepřítomnost nádoru v regionálních lymfatických uzlinách a M je označení pro přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz. [32] Po vyhodnocení TNM lze určit stadium onemocnění, jak dokládá přiložená Tab. 1 na str. 9.

Všechna tato kritéria mají zásadní význam pro určení prognózy onemocnění a následnou volbu co nejefektivnějšího způsobu léčby každého individuálního pacienta.

Tab. 1 Stadium FIGO nádorů vaječníků na základě TNM klasifikace, převzato a upraveno [33]

Stadium FIGO	Klasifikace TNM	Nádor vaječníků
I	T1	Nádor na vaječníku
IA	T1a	Nádor na jednom vaječníku, žádné metastáze
IB	T1b	Nádor na obou vaječnících
IC	T1c	Nádor na jednom nebo obou vaječnících, „ruptura“ pouzdra, maligní buňky v peritoneálním výplachu
II	T2	Nádor se šíří do pánve
IIA	T2a	Nádor se šíří na dělohu a/nebo vejcovody
IIB	T2b	Nádor se šíří do dalších tkání v pánvi
III	T3	Nádor na jednom nebo obou vaječnících, metastáze na peritoneu a/nebo na regionálních lymfatických uzlinách
IIIA	T3a	Mikroskopické metastázy na peritoneu
IIIB	T3b	Makroskopické metastázy (do 2 cm), mohou se vyskytnout metastázy regionálních lymfatických uzlin
IIIC	T3c	Makroskopické metastázy (nad 2 cm), mohou se vyskytnout metastázy regionálních lymfatických uzlin
IV	T4	Vzdálené metastázy

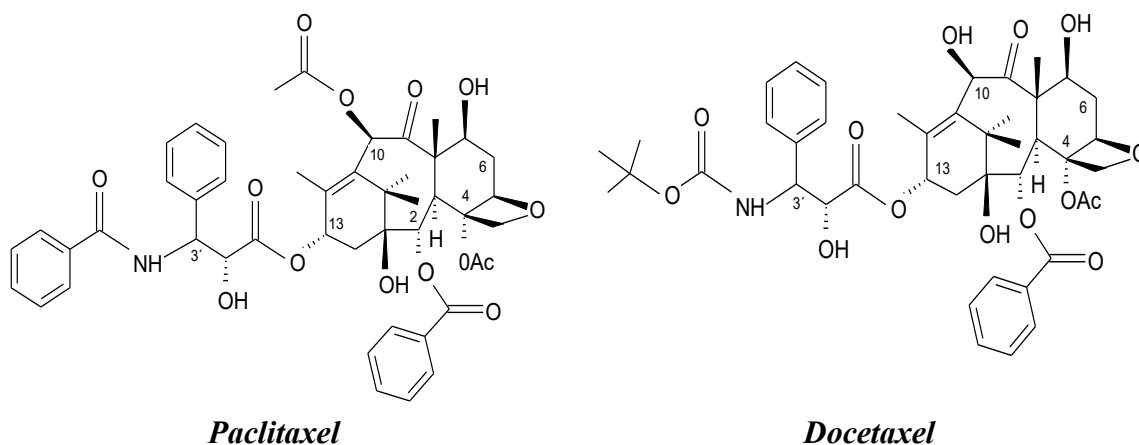
1.2.2 Terapie nádorů vaječníků

V terapii nádoru vaječníků se využívají kombinované postupy, ale vždy se terapie posuzuje individuálně vzhledem k typu nádoru, zasažení okolních míst a celkovému stavu pacientky. Téměř v 90 % je léčba nádorů vaječníků zahájena primární cytoredukční operací s cílem odstranění co největšího možného množství nádorové hmoty. Odstranění nádoru rovněž umožní biopsii a histologické stanovení typu nádoru i postižení okolních tkání. Po chirurgickém zákroku obvykle následuje adjuvantní chemoterapie. [6] Role chirurgie v léčbě nádorů vaječníků je tedy společně s chemoterapií stěžejní. Kromě těchto základních léčebných modalit jsou v terapii nádorů vaječníků omezeně používány hormonální léčba a radioterapie, často využívaná u chemorezistentních recidiv onemocnění. [34]

V chemoterapeutické léčbě je v současné době „zlatým standardem“ využití derivátů platiny, obvykle karboplatiny v kombinaci s taxany, především paclitaxelem. Kompletní odpověď na primární chemoterapii je sice vysoká, přesto 50–75 % pacientek s pokročilým ovariálním karcinomem relabuje a dochází k progresi onemocnění a rozvoji mnohočetné lékové rezistence (MDR, z angl. „Multi Drug Resistance“), která je v současné době hlavním klinickým problémem cytostatické léčby ovariálního karcinomu. [34, 35]

1.3 Taxany

Jak již bylo zmíněno, v terapii nádorů vaječníků zaujímá velmi důležitou úlohu skupina antimitotických cytostatik taxanů. Ty jsou velmi významnou skupinou chemoterapeutik používanou v léčbě celé řady solidních nádorů, kromě vaječníků např. prsu, plic, ale také pankreatu, prostaty či děložního hrdla. [36] Konvenční taxany jsou zastoupeny zejména dvěma léčivy paclitaxelem a docetaxelem. Paclitaxel (TAXOL®) byl původně izolován z kůry tisů červeného (*Taxus brevifolia*), v dnešní době je již připravován semi-synteticky. Docetaxel (TAXOTERE®) se v přírodě nevyskytuje a je připravován z části synteticky z 10-deacetylbaecatinu III, inaktivního prekursoru získávaného z jehličí tisů evropského (*Taxus baccata*). [37] Základní struktury paclitaxelu a docetaxelu jsou uvedeny na Obr. 5.



Obr. 5 Chemická struktura paclitaxelu a docetaxelu, převzato z [38]

1.3.1 Mechanismus účinku taxanů

Taxany se řadí mezi skupinu *tzv. „mitotických jedů“*. Cytotoxická aktivita taxanů je způsobena vazbou na tubulin v buňce, důsledkem toho je deformovaná struktura mikrotu-

bulů. Nefunkčnost mikrotubulů vede k ukončení mitosy a následně k buněčné smrti. [39] Mikrotubuly se skládají z heterodimerů proteinových vláken α a β tubulinů. Každý monomer je tvořen 3 hlavními funkčními doménami. N-terminální doména se podílí na vazbě k nukleotidu, centrální doména zabezpečuje vazbu mezi N a C koncem, C-terminální doména slouží k vazbě na proteiny. [40] Tubuliny se formují do protofilament a ty pak tvoří mikrotubuly, které mají nezastupitelnou funkci v buňce. [41] Podílejí se na utváření tvaru buňky, pohybu, signalizaci a také na buněčném dělení a mitose. Vzhledem k těmto funkcím se mikrotubuly řadí mezi vysoce významný terapeutický cíl. [40]

Taxany svým působením urychlují vznik mikrotubulů a jejich stabilizaci. Zabraňují jejich depolymerizaci na volný tubulin, a tím narušují správný průběh mitosy. U dvou běžně používaných taxanů – paclitaxelu a docetaxelu je známo, že docetaxel je účinnější ve stabilizaci mikrotubulů i v inhibici depolymerizace. Taxany zasahují v různých fázích buněčného cyklu. Již zmíněný docetaxel působí v S-fázi, oproti tomu paclitaxel v G_2/M -fázi. [41] Ačkoliv primárním mechanismem účinku taxanů je blokáda mitosy, nedávno bylo prokázáno, že ovlivňují také signalizaci androgenního receptoru (AR). Taxany inhibují vaznost ligandu k tomuto receptoru a na úrovni transkripce ovlivňují cílové geny této dráhy, jako je např. prostatický specifický antigen (PSA). [42]. Dalším známým mechanismem účinku je pak indukce procesu apoptózy (programované smrti buňky) inaktivací onkogenu Bcl-2 („B-cell lymphoma“). [41]

1.3.2 Metabolismus taxanů

Metabolismus všech taxanů zatím není plně objasněn, ale je známo několik aspektů metabolismu paclitaxelu. Paclitaxel je metabolizován primárně v játrech a jeho metabolity jsou vyloučeny žlučí. [43], přičemž vyloučení z organismu je regulováno širokým spektrem proteinů. Oxidační metabolismus je regulován cytochromy P450. Údaje pocházející z experimentů s jaterními mikrosomy vypovídají, že primárně cytochromy P450 2C8 a 3A4 jsou primárně zodpovědné za metabolismus paclitaxelu. Cytochrom P450 2C8 vykazuje až $2,5\times$ vyšší produkci metabolitů než cytochrom P450 3A4. [44] Cresteil a kol. ve své práci našli 5 metabolitů ve žluči pacientů, z nichž 3 byly hydroxylované. Kompletní struktura těchto metabolitů byla stanovena pomocí NMR. Hlavní metabolit paclitaxelu je monohydroxylovaný derivát na C6 poloze hlavního taxanového kruhu – 6 α -hydroxypaclitaxel. Další metabolit je hydroxylovaný produkt na C3' fenylového zbytku taxanového kruhu – C3'-hydroxypaclitaxel. [45] V menším množství byl nalezen v játrech

a mikrosomech metabolit dihydroxypaclitaxel, který vznikl z 6 α -hydroxypaclitaxelu. [43] Za hlavní metabolickou cestou přeměny paclitaxelu na monohydroxylovaný produkt na uhlíku C6 stojí cytochrom P450 2C8, C3'-hydroxypaclitaxel vzniká za účasti cytochromu P450 3A4. [45] Také bylo zjištěno, že metabolity jsou pro organismus mnohem méně cytotoxické než původní léčivo. [43]

Docetaxel je metabolizován výlučně v játrech, přičemž hlavní metabolickou cestou jsou postupné oxidace *terc*-butyl esterové skupiny na postranním řetězci. Hlavním metabolitem je hydroxydocetaxel, následně oxidovaný přes nestálý aldehyd na dva diastereomerní hydroxyoxazolidinony A a B. Dalšími metabolickými cestami jsou vznik oxazolidinonu z hydroxydocetaxelu a 7-epimerizace docetaxelu. [38, 46, 47] Metabolismu docetaxelu se účastní cytochromy P450 podrodiny 3A, konkrétně enzymy cytochrom P450 3A4 a 3A5. [38]

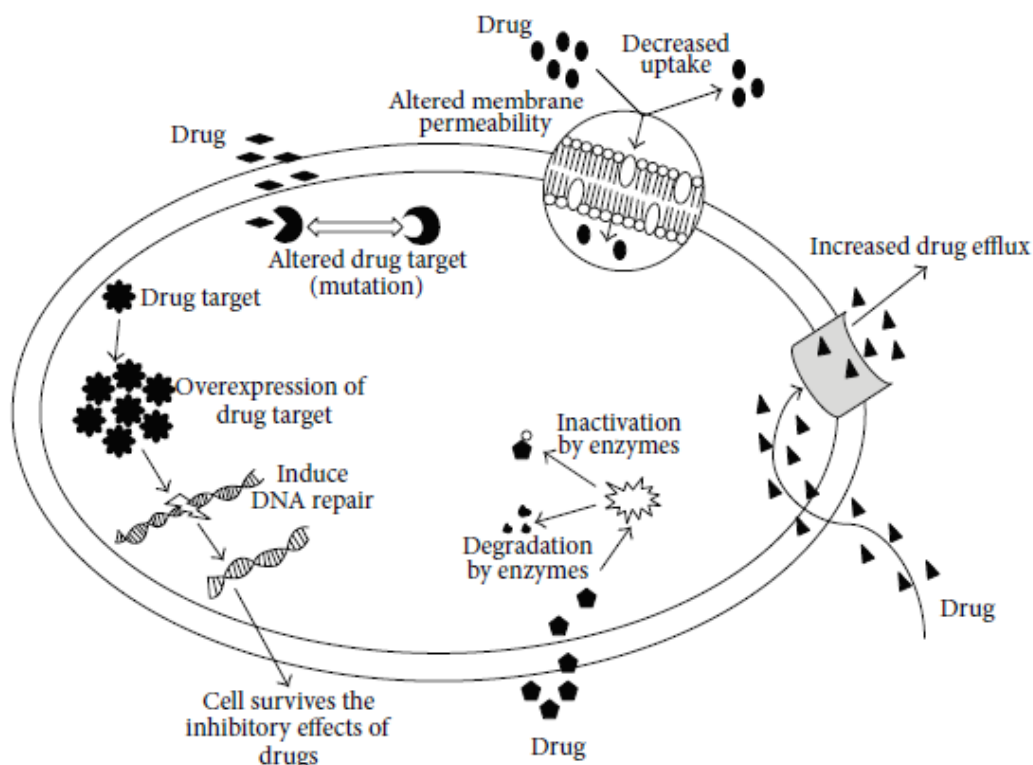
Využití taxanů v klinické praxi je doprovázeno celou řadou nežádoucích účinků typických pro protinádorová léčiva, jako je alopecie, neutropenie, gastrointestinální potíže, neurotoxicita či kardiovaskulární toxicita. [15, 16, 17, 18, 19] Určitě největší překážkou je ovšem rozvoj MDR, detailně popsáné v následující kapitole 1.4. [48] MDR je hlavním problémem v úspěšné terapii nejen ovariálních nádorů, kde jsou taxany hlavně využívány, ale i celé řady dalších solidních nádorů.

1.4 Mnohočetná léková rezistence

Jak už bylo zmíněno, mnohočetná léková rezistence patří mezi vážné komplikace v chemoterapii. Nádorové buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již při prvním podání, hovoříme o tzv. primární rezistenci. Sekundární rezistence se vytváří až v průběhu léčby, kdy senzitivní buňky přestávají být vůči léčbě citlivé a stávají se také rezistentními, snižuje se tak účinnost léčby. V případě, že rezistence vůči jednomu léčivu může mít za následek vznik rezistence vůči léčivu druhému (většinou však strukturálně podobnému), hovoří se o zkřížené rezistenci. Pokud se daná dvě léčiva liší strukturně i mechanismem účinku, popisujeme tento jev jako mnohočetnou lékovou rezistenci. [49]

Možné mechanismy vzniku mnohočetné lékové rezistence jsou následující a shrnuje je Obr. 6 str. 14.

- *Změny farmakokinetiky*
 - může docházet ke zvýšenému vylučování chemoterapeutika buňkou, a tak ke snížení účinnosti nebo ke snížení resorpce
 - může dojít ke změně v enzimech, které dané chemoterapeutikum metabolizují na účinnou látku či naopak k větší aktivitě enzymů, které se podílejí na rychlejším odbourávání chemoterapeutik
- *Změny cytokinetiky*
 - v případě velkého množení nádorových buněk značná část přejde do G₀-fáze buněčného cyklu, kde je snížena citlivost k chemoterapeutikům
 - s množením buněk souvisí i vznik spontánních sekundárních mutací, které zapříčiňují vznik rezistentních buněčných klonů
- *Jiný průchod léčiva buněčnou membránou*
 - Nejčastější souvislost je popisována s membránovými transportéry ABC a jejich zvýšenou expresí
- *Narušení buněčné smrti (apoptózy)*
 - Za tímto mechanismem stojí např. proapoptotické efekторы a molekuly p53, BAX, FAS důležité v procesu signalizace apoptózy [49, 50, 51]
- *Alterace buněčných cílů a DNA reparačního systému*
 - Mutace v genu pro topoizomerázu II pravděpodobně stojí za vznikem MDR vůči inhibitorům topoizomeráz [52]
 - Mutace tubulinu β -tubulinových podjednotek ovlivňuje účinnost antimitotických jedů taxanů [53]



Obr. 6 Možné mechanismy vzniku mnohočetné lékové rezistence. Převzato z [51]

V souvislosti s taxany je nejčastěji rezistence spojována s alteracemi v expresi membránových transportních proteinů ABC („ATP“ binding cassette), např. P-glykoproteinu, P-gp. P-gp je produktem genu *MDR1* a je také označován jako ABCB1 („ATP binding cassette, subfamily B, member 1“) lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 7. Jedná se o glykoprotein, pro jehož funkci je nezbytná energie ATP. Vazba léčiva na P-gp, způsobí aktivaci jedné z vazebných domén a následně díky hydrolýze ATP dojde ke konformační změně v P-gp, což umožní uvolnění léčiva do extracelulárního prostoru. P-gp je schopen vázat širokou škálu hydrofobních léčiv, např. paclitaxel, doxorubicin, vinkristin, vinblastin. [40]

Na úrovni nádorových buněčných linií bylo zjištěno, že nižší exprese *MDR1* zvyšuje citlivost vůči paclitaxelu. [40]

Protein LRP („Lung resistance - related protein“) byl nalezen v cytoplasmě a je exprimován buňkami, které jsou vystaveny toxickým látkám. Některé práce naznačují, že protein LRP může způsobovat MDR u pacientek s ovariálním karcinomem. [52]

Protože rezistence nádorových buněk představuje závažný problém v úspěšné léčbě solidních nádorů, jsou v současné době hledány možnosti, jak rozvoji MDR zabránit, či vyvinout takové terapeutické režimy, které by byly účinné u rezistentních forem nádorů.

1.5 Možnosti překonání MDR vůči taxanům

1.5.1 Nové deriváty taxanů

Vývoj a syntéza derivátů konvenčních taxanů, které nepodléhají metabolické inaktivaci, exportu mimo nádorové buňky membránovými transportéry, ev. podporují apoptózu či zpomalují nebo zastavují buněčný cyklus, jsou jednou z možností překonání problému MDR vůči konvenčním taxanům. [54] Na základě rozsáhlých studií vztahů mezi strukturou a aktivitou taxanů, byla dosud syntetizována řada nových derivátů konvenčních taxanů. Přehled hlavních zástupců nových taxanových derivátů je uveden v Tab. 2. [55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]

Tab. 2 Přehled skupin nových derivátů odvozených od konvenčních taxanů s potenciálem pro klinické využití v terapii nádorových onemocnění [55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]

Perorální taxany	Taxany s modifikacemi C10, C12 a C3'N	Fluorované deriváty taxanů	Semisyntetické deriváty taxanů odvozené z 10-deacetylbaecatinu III	Paclitaxel vázaný na albumin
Tesetaxel	SB-T-1211	SB-T-12851	Cabazitaxel	Abraxane
Paclitaxel Poliglumex	SB-T-1214 SB-T-1216	SB-T-12852 SB-T-12853	Larotaxel	
Paclitaxel s emulzí vit. E BMS-275183	SB-T-121303 SB-T-1213031 IDN5390 a IDN5109	SB-T-12854		

Řada z těchto derivátů (SB-T-1102, SB-T-1103, SB-T-1214, SB-T-1216, SB-T-12851, SB-T-12852, SB-T-12853, SB-T-12854, IDN5109 a IDN5390) je velmi účinná *in vitro*, v různých typech rezistentních nádorových buněčných linií lišících se změnami v expresních profilech membránových transportérů nebo přítomností různých isoform tubulinových podjednotek [37, 48, 57, 56, 63]. Některé z nových taxanů prokázaly účinek rovněž *in vivo*, v myších xenograftech (pozn.: zvířecí model s transplantovanými lidskými nádorovými buňkami) např. SB-T-1214 u rezistentního nádoru tlustého střeva. [64] Taxany SB-T-1214, SB-T-12854 a IDN5109 potlačovaly účinněji než paclitaxel růst lidského lymfomu [57]. V nedávné studii *in vivo* s myšími xenografty nádoru pankreatu byl účinný nový taxan SB-T-1216, který navíc významně potlačoval expresi genů dráhy Hedgehog jako signální dráhy u nádoru pankreatu a potenciálně nového terapeutického cíle pro léčbu tohoto agresivního nádoru. [65] Vzhledem ke klinickému využití byl doposud v roce 2012 schválen nab-paclitaxel (Abraxane[®]) pro léčbu nemalobuněčného nádoru plic v kombinaci s karboplatinou. [66] Tento taxan je také účinný při léčbě karcinomu prsu a metastatického karcinomu pankreatu. [67, 68]

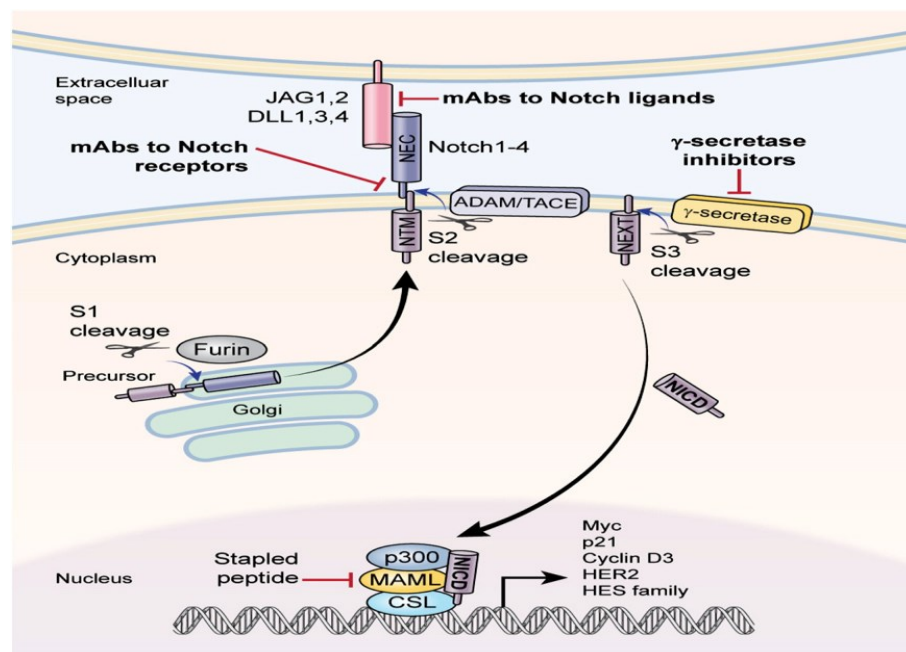
Na Oddělení toxikogenomiky SZÚ v Praze je díky dlouhodobé spolupráci s pracovištěm prof. Iwao Ojimy (New York University v Stony Brook, NY, USA) jedinečná možnost studovat účinnost derivátů SB-T konvenčních taxanů a podílet se na jejich selekci a výběru pro potenciální klinické testování. Tým prof. Iwao Ojimy na základě strukturních a aktivačních studií připravil řadu derivátů konvenčních taxanů se syntetickými modifikacemi na pozici C-2, C-10 a C-3 paclitaxelu [69], u kterých byla prokázána vysoká účinnost v podmínkách *in vitro* [48, 54, 57, 56, 70] či *in vivo* v případě taxanů SB-T-1214 a SB-T-1216. [57, 65] V rámci diplomové práce byla sledována skupina zcela nových derivátů taxanů, tzv. taxanů III. generace (SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) odvozených od nejslibnějších struktur SB-T-1214 a SB-T-1216 a syntetizovaných s cílem snížit jejich metabolickou inaktivaci s následným možným použitím nižších koncentrací těchto taxanů tak, aby bylo zabráněno jejich toxickým účinkům na zdravé tkáně organismu. Taxany III. generace byly syntetizovány v roce 2016 a povaha jejich působení dosud nebyla studována.

1.5.2 Signální dráha Notch jako terapeutický cíl

Další možností terapie zvláště u rezistentních forem nádorů je využití signální dráhy Notch jako buněčného terapeutického cíle. Signální dráha Notch hraje důležitou roli v rozmnožování, diferenciaci, zprostředkování buněčných odpovědí a vývoji. V embryonálním vývoji se podílí na komunikaci mezi buňkami prostřednictvím kontroly buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. V pozdějším vývoji se podílí také na vývoji mléčné žlázy, zrání gastrointestinálního epitelu nebo například regulaci imunitního systému. [71, 72, 73] Základ této dráhy tvoří receptory Notch a jejich ligandy. Receptor Notch byl poprvé popsán v *Drosophile* před více než sto lety. Jedná se transmembránový receptor, který kóduje zhruba 2500 aminokyselin. [74] Ačkoliv byl tento receptor charakterizován jako neurogenetický, pozdější studie využívající *Drosophily* ukázaly, že se jedná o receptor vyskytující se v různých tkáních [75], přičemž tuto dráhu v *Drosophile* tvoří ještě dva ligandy – Delta a Serrate. [74] U savců rozeznáváme čtyři transmembránové heterodimerní receptory Notch (Notch1 – 4), na které se váže pět specifických ligandů (Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like3 a Delta-like4). [75, 76] Receptory Notch patří do rodiny transmembránových proteinů o velikosti zhruba 300 kDa s „EGF-like“ repeticí v extracelulární doméně. Je zde umístěno až 36 „epidermálních růstových faktorů“ (EGF), které jsou nezbytné pro vazbu ligandu. Spousta EGF repetice váže vápník, který tak hraje významnou roli v určování struktury a afinitě k ligandu. [77] Také glykosylace fukosou zprostředkovaná glykosyltransferasami určuje afinitu receptoru k ligandu a vazebnou sílu. Intracelulární doména receptoru se od extracelulární odlišuje, je složena z několika proteinových domén potřebných pro buněčnou signalizaci. [74, 77]

Receptory Notch jsou syntetizované v endoplazmatickém retikulu jako peptidové prekursor, které jsou následně transportovány a proteolyticky rozštěpeny v Golgiho aparátu prvním procesem štěpení (S1) „furin-like“ konvertasami a teprve potom jsou vzniklé nekovalentně vázané heterodimerické receptory umístěny do plazmatické membrány. Tyto heterodimery jsou tvořeny N-koncovou částí v extracelulární doméně (NECD), na kterou se vážou ligandy a C-koncem, který zahrnuje jednak transmembránovou část a jednak intracelulární doménu Notch (NICD). Všechny receptory a ligandy jsou „jednosměrné“. [76]

K aktivaci signální dráhy dochází tehdy, jsou-li buňky v těsném kontaktu. Receptory Notch jsou aktivovány prostřednictvím ligandů, které se souhrnně označují jako DSL („Delta, Serrate, Lag 2“). [77] K přenosu signálu dochází pouze tehdy, jsou-li receptor a ligand na sebe navázány. [74] Ve chvíli, kdy dojde k vazbě ligandu jedné buňky na receptor buňky druhé, může dojít ke druhému (S2) štěpení katalyzovaném enzymem náležícím do skupiny metaloproteas, který je známý jako TACE („tumor necrosis factor α converting enzyme“) a nebo ke třetímu štěpení (S3) za účasti enzymového komplexu γ -sekretasy, spadajícího pod integrální membránové proteiny. Tato štěpení vedou k uvolnění NICD do cytoplazmy a ta pak putuje do jádra, kde může ovlivnit transkripci cílových genů. Po translokaci do jádra se NICD váže na transkripční faktor CSL („CBF1, Suppressor of hairless, Longevity assurance gene 1“), a tím přemění represor na transkripčně aktivní komplex. Tento komplex se skládá primárně z NICD, CSL, MAML („mastermind-like protein“), SKIP („ski-interacting protein“) a p300, přičemž funkční komplex aktivuje transkripci cílových genů Notch. Celý mechanismus je znázorněn na Obr. 7. [71] Přítomnost různých ligandů vede k různorodé signalizaci. Například bylo zjištěno, že ligandy JAG1 a DLL1 mají menší afinitu k receptoru NOTCH1 než ligand DLL4, což může mít vliv na transkripci. [75]



Obr. 7 Proces mechanismu přenosu signálu prostřednictvím signální dráhy Notch, převzato z [71]

Mnoho signálů zprostředkovaných receptory Notch má různé důsledky. Poměrně omezený soubor cílových genů byl objeven v různých vývojových stádiích. Například geny „hairy enhancer of split“ (*HES*) jsou vysoce konzervované a regulované prostřednictvím receptoru Notch ve více buněčných typech. Tyto geny byly nejprve popsány jako neurogenní geny v *Drosophile*. Několik studií konstatovalo, že tyto geny, stejně jako geny jim příbuzné, mohou být přímými cílovými geny Notch dráhy. [75] a uplatňovat se v karcinogenezi a progresi nádoru. [71, 78] Klíčovým zástupcem rodiny HES je Hes1 protein (kódovaný genem *HES1*), který hraje důležitou roli v buněčné diferenciaci, procesu apoptózy a přispívá k tvorbě metastáz a progresi nádorů. [79] Jedná se o přímý cílový gen signální dráhy Notch a skrze ni je jeho transkripce aktivována. Upregulace Hes1 je odrazem zvýšené aktivity signální dráhy Notch, a byla pozorována např. u karcinomu prsu, pankreatu či osteosarkomu. [80, 81, 82]

V této diplomové práci byla tedy kromě samotných genů signální dráhy Notch sledována i exprese genu *HES1* a její význam u ovariálních nádorů.

1.5.2.1 Signální dráha Notch a ovariální karcinom

Signální dráha Notch má velký význam pro buněčnou komunikaci a udržení buněčné stability. Deregulace této dráhy může vést k porušení těchto procesů a vývoji onemocnění, včetně nádorových. Vzrůstající počet studií v poslední době tento fakt potvrzuje. [71]

U pacientek s ovariálním karcinomem byla zjištěna vysoká exprese genu *NOTCH3*, která byla doprovázena expresí *JAG1* a *JAG2*. Expresе těchto genů navíc korelovala s vyšším stádiem onemocnění a horším přežíváním. [76]

Gen *NOTCH3* byl také exprimován výrazně více (až 3×) v nádorové tkáni vaječníků oproti kontrolní tkáni. Spolu s tímto genem byly upregulovány další tři geny. Celkově tyto 4 geny významně rozlišují nádorovou a kontrolní ovariální tkáň. Dále bylo studováno, který ligand má nejvyšší afinitu k receptoru NOTCH3 a bylo zjištěno, že se jedná o ligand JAG1 (gen *JAG1* má nejvyšší expresní hodnotu). [83] Další studie dokládá, že taktéž ligand JAG2 má velkou afinitu k NOTCH3 v nádorových buňkách ovarií serózního typu. [84]

Farmakologická inhibice signální dráhy Notch představuje jednu z možností cílené terapie. V této souvislosti se nové studie zaměřují na malé inhibitory γ -sekretasy, která uvolňuje NICD („nuclear intracellular domain“) a také na molekuly monoklonálních protilátek k receptorům nebo ligandům. [76, 85, 86, 87]

Ačkoliv preklinické modely naznačují, že inhibitory γ -sekretasy potlačují růst nádoru, léčba *in vivo* je spojena s mnoha významnými nežádoucími účinky, proto musí být navrženo specifické cílení signální dráhy Notch. [76]

Na Oddělení toxikogenomiky SZÚ bylo v rámci předchozích studií nalezeno významné snížení genové exprese složek signální dráhy Notch v rezistentních nádorových buňkách karcinomu ovaria po aplikaci taxanů. Toto zjištění dosud nebylo publikováno. Toto ovlivnění exprese složek dráhy Notch může být jednak dalším z mechanismů působení taxanů a jednak může být tato dráha velmi dobře využita jako potenciální terapeutický cíl pro léčbu rezistentních forem ovariálních nádorů. Vzhledem k velkému významu této dráhy v karcinogenezi a jejímu velkému potenciálu jako terapeutického cíle, byl v předkládané diplomové práci sledován její význam přímo u pacientek s karcinomem ovaria.

2 Cíle práce

1) Prvním cílem předkládané diplomové práce byla studie in vitro, porovnávající účinnost konvenčního taxanu paclitaxelu a nových taxanových derivátů SB-T v experimentální nádorové ovariální buněčné linii NCI/ADR-RES s cílem vybrat potenciálně nejúčinnější taxanové deriváty pro rezistentní formy nádorových buněk. K dosažení tohoto cíle byly provedeny následující analýzy:

- Stanovení hodnoty IC_{50} Paclitaxelu a osmi taxanových derivátů SB-T v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence
- Stanovení vlivu vybraných nejúčinnějších taxanových derivátů SB-T na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie

2) Druhým cílem diplomové práce bylo studium genového expresního profilu signální dráhy Notch u pacientek s nádory vaječníků. Signální dráha Notch se jeví být deregulována působením taxanů *in vitro*, a proto byla vybrána pro studium její úlohy u pacientek s nádory vaječníků. Cílem bylo zjistit úlohu této dráhy a jejích cílových genů přímo ve vzorcích pacientek s nádorem vaječníků a nalézt případný vztah míry exprese složek signální dráhy Notch k prognóze, progresi a přežívání pacientek s ovariálním nádorem. K dosažení tohoto cíle byly provedeny následující analýzy:

- Příprava cDNA vzorků nádorové a kontrolní ovariální tkáně metodou reverzní transkripce
- Stanovení hladiny genové exprese (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, JAG1, JAG2, DLL1, DLL4, HES1, CNTN1) pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase normalizované vůči referenčním genům (YWHAZ, UBI, PPIA)
- Porovnání hladiny sledovaných genů v nádorové a kontrolní ovariální tkáni
- Statistické hodnocení a hledání souvislosti míry genové exprese složek signální dráhy Notch s klinicko-patologickými daty pacientek s nádory vaječníků
- Statistické hodnocení a hledání vztahů mezi genovou expresí složek signální dráhy Notch a přežíváním pacientek s nádory vaječníků

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Výrobce	Použité chemikálie
Agilent Technologies	Agilent RNA 6000 Nano Kit
Ambion®	Nuclease free H ₂ O
Becton Dickinson	Polystyrenové kuličky BD FACSuite
Invitrogen	Primery pro gen UBI
	Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent Kit
Laboratory of prof. Iwao Ojima Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, NY, USA	SB-T-1214, SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606
Lachema	Ethanol (čistý)
Life Technologies	TaqMan® Gene Expression Assay, přehled použitých Assays uveden v Tab. 4 na str. 34 a Tab. 5 na str. 34
Linde	Tekutý dusík
New England Biolabs	ΦX174 DNA-HaeIIIDigest marker
PanBiotech	RPMI 1640 s L-glutaminem
	NaHCO ₃
	penicilin
	streptomycin
	pyruvát sodný
	HEPES pufr
	FBS
	merkaptotoethanol

Výrobce	Použité chemikálie
PanBiotech	trypsin
QIAGEN	AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit
Sigma	Agarosa
	Annexin V Kit
	Ethidium Bromid
	Propidium Jodid
	RNasa
	TE (Tris-EDTA) pufr
Solis BioDyne	5×HOT FIREPol® Master Mix RTL
	5×HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX)
Thermo Fisher Scientific	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

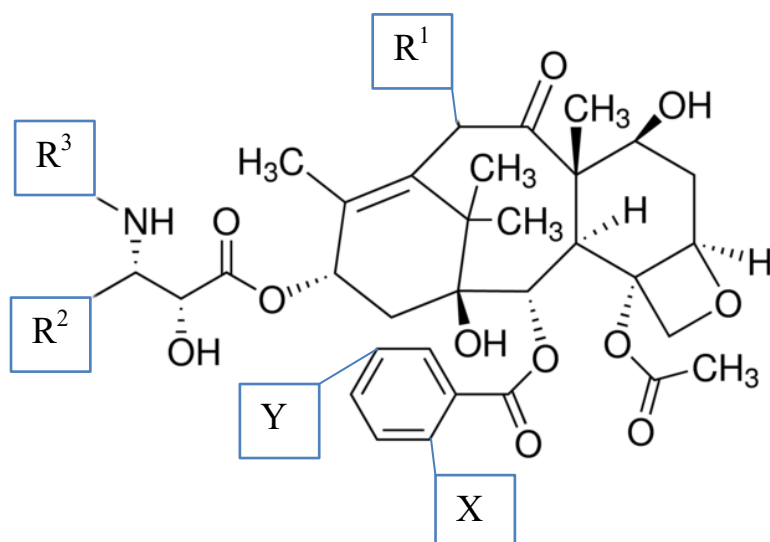
3.2 Použité přístroje

Výrobce	Použité přístroje
ACEA Biosciences, Inc.	xCELLigence
Agilent Technologies	Agilent 2100 Bioanalyzer
Applied Biosystems	Cykler – GeneAmp 9700 PCR System
	Vii7 Real time PCR System
Becton Dickinson	Průtokový cytometr FACSVerse™
Boeco	Předvážky
Clean Air Technik	Laminární box

Výrobce	Použité přístroje
Gilson, Inc.	Pomocná pipetovací destička Trackman
HERMLE Labortechnik	Centrifuga – Z 323 K (radius rotoru 140 mm)
	Centrifuga – Z 360 K (radius rotoru 104 mm)
IKA®	Vortex (MS 3 basic)
Julabo	Vodní lázeň TW8
Labnet	Mikrocentrifuga
	Třepačka (Shaker 35)
LI-COR	Odyssey® Fc Imaging system
Major Science	Termoblok (Dry bath Incubator)
OPTIKA Microscopes	Optický světelný mikroskop (XDS-1R)
SANYO	CO ₂ -inkubátor – MCO-18AIC
Schuett	Kahan Flammy L
TECAN	Infinite® M200
ThermoScientific	Elektroforetický zdroj napětí (Owl EC-105 Compact)
Whirlpool	Mikrovlnná trouba JET 900W

3.3 Metody použité v části studie *in vitro*

Účinnost sady nových experimentálních taxanových derivátů (SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) v porovnání s konvenčním taxanovým cytostatikem paclitaxelem a taxany druhé generace (SB-T-1214 a SB-T-1216) byla sledována v nádorové buněčné linii ovariálního karcinomu (NCI/ADR-RES) za pomoci metodik *in vitro*. Struktura taxanů a jejich derivátů je ilustrována na Obr. 8 a Tab. 3 na str. 25.



Obr. 8 Základní struktura taxanu a taxanových derivátů

Tab. 3 Možné substituenty taxanů

Taxany	Substituent				
	R ¹	R ²	R ³	X	Y
Konvenční taxany					
Paclitaxel	Ac	Ph	PhCO	H	H
Docetaxel	H	Ph	t-Boc	H	H
Taxany II. generace					
SB-T-1214	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	H	H
SB-T-1216	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	H	H
Taxany III. generace					
SB-T-121402	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	Me	H
SB-T-121602	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	Me	H
SB-T-121405	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121605	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121406	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₂ H	H
SB-T-121606	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₂ H	H

3.3.1 Práce s buněčnými kulturami a jejich charakterizace

Práci s buněčnými kulturami jsem prováděla pod vedením Ing. Marie Ehrlichové (Oddělení toxikogenomiky, SZÚ Praha). Práce s buněčnými kulturami vyžaduje sterilní prostředí, proto bylo po celou dobu pracováno v laminárním boxu a byl použit laboratorní plášť určený speciálně pro práci s buněčnými kulturami. Po celou dobu bylo pracováno v rukavicích bez pudru a se sterilními pomůckami. Před každým použitím byl laminární box 2 hodiny „vysvícen“ UV zářením. K desinfekci povrchů při práci byl využíván 70% ethanol (pro čištění pracovní plochy a dezinfekci), jednorázové sterilní plastové pipety a plastové pomůcky, speciálně určené pro práci s buněčnými kulturami, byly vždy po dobu 5 hodin při 120 °C sterilizovány. Použité kultivační médium a trypsin byly otevírány v laminárním boxu nad kahanem, ostatní pomůcky nebyly mimo laminární box otevírány vůbec.

V rámci předkládané práce byla použita jedna nádorová buněčná linie ovariálního karcinomu -NCI/ADR-RES, která je rezistentní vůči konvenčním taxanům. [37] O této buněčné linii se dlouho hovořilo jako o nádorové linii prsu, roku 2007 její podrobný histologický popis ukázal, že se jedná o nádorovou buněčnou linii vaječníků. [88] Buněčná linie pochází z ATCC, USA (American type culture collection).

Použitá buněčná linie NCI/ADR-RES, byla pěstována v médiu RPMI 1640 s L-glutaminem (300 mg/l), NaHCO_3 (2,2 g/l), ke kterému byl přidán penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), pyruvát sodný (100 mM), HEPES pufr (1M), FBS – „fetal bovine serum“ - (výsledná koncentrace 10%). Buněčná linie byla pěstována při 37 °C v inkubátoru s atmosférou 5% CO_2 . Autenticita linie je vždy kontrolována před započítím a po ukončení experimentů pomocí analýzy STR („short tandem repeat“) prováděné na přístroji DNA Analyzer 3100 s využitím softwaru Gene Mapper[®] ID-Software v1.2 (Applied Biosystems).

Buňky byly každý 3. – 4. den pasážovány. Před pasážováním byly temperovány roztoky média a trypsinu (0,25% trypsin (w/w), 0,02% (w/w) EDTA) ve vodní lázni při 37 °C. Před pasážováním byla morfologie buněk kontrolována pod mikroskopem a následně jim bylo odebráno médium. Poté byl přidán trypsin dle zavedeného postupu. Kultivační láhev nebo miska byla umístěna do CO_2 -inkubátoru a byla tam ponechána tak dlouho, dokud se buňky z povrchu lahve neuvolnily. V novém médiu byly buňky suspendovány a přene-

seny do nové kultivační nádoby. Znovu pasážovány byly opět 3. – 4. den. K experimentům byly použity buňky v maximálně 35. pasáži.

3.3.2 Stanovení cytotoxicity taxanů pomocí xCELLigence RTCA DP

Při experimentech bylo pracováno v laminárním boxu, laboratorním pláští a rukavicích bez pudru. K vyhodnocení IC_{50} bylo využito přístroje xCELLigence, který byl uzavřen v CO_2 -inkubátoru a temperován po dobu minimálně 3 hodin. (Hodnoty IC_{50} byly vypočítány přímo softwarem xCELLigence RTCA DP.) Před každým stanovením pak byla měřena rezistorová destička, pro ověření správnosti kontaktů (první krok).

Destička je velmi specifická. Její dno je z velké části pokryto zlatými mikroelektrodami. V případě nepřítomnosti buněk proudí volně elektrický proud prostřednictvím kultivačního média a dokončí obvod mezi elektrodami. Po přidání buněčné suspenze buňky postupně adherují a přiléhají k elektrodám, tok elektrického proudu je narušen. Hodnota impedance je zaznamenávána jako bezjednotková veličina zvaná „Cell Index“ (CI). [89]

Do jamek v destičce (E-Plate 16) bylo pipetováno vždy 100 μ l příslušného média, tato destička byla vložena do přístroje a byl spuštěn první krok – měření pozadí. Destička byla poté ponechána v laminárním boxu. Buňky byly „sklizeny“ inkubací s trypsinem a suspendovány v 10 ml čerstvého média, tak jak je popsáno v kapitole 3.3.1. Část ($2 \times 50 \mu$ l) byla odebrána pro počítání buněk v Bürkerově komůrce a zbytek byl centrifugován v centrifuze (Z 323 K) 8 minut při 1200 otáčkách a za laboratorní teploty.

Bürkerova komůrka je malé sklíčko s 0,1mm vrypy. Jsou na něm dva stejně velké čtverce, ve kterých jsou umístěny čtverce menší, dobře viditelné pod mikroskopem. Dle rozložení jednotlivých buněk na plochách čtverců a hloubky vrypu se vypočítává objem, který je dále využit na přepočet k celkovému počtu buněk v daném objemu.

Buněčná suspenze byla ředěna na 10 000 buněk/100 μ l a byla přidána do všech jamek, vždy po 100 μ l. Destička byla ponechána v laminárním boxu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a poté byla vložena do přístroje xCELLigence a byl spuštěn druhý krok. Buňky po dobu 18 hodin adherovaly. Po 18 hodinách byl přidán roztok s různými koncentracemi taxanu (3, 10, 30, 100, 300, 1000 a 3000 nM; nebo byla škála posunuta o dvě další hodnoty 10 000 a 30 000 nM) a ke kontrolám bylo přidáno médium. Byl spuštěn krok tři, kde byla snímána hodnota CI v reálném čase po 15 minutách po dobu 24 hodin. Krok 4 probíhal ihned poté a také celkem 24 hodin, zaznamenán byl průběh po 30 minutách. V kroku 5 byl průběh zaznamenáván každou hodinu z celkových 24 hodin.

Stanovení pro každé použité cytostatikum proběhlo v duplikátech; u nejúčinnějších taxanů měření proběhlo ve dvou nezávislých měřeních pro potvrzení výsledků.

3.3.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda využívaná v mnoha oborech. Tato metoda je schopná zachytit optické a fluorescenční charakteristiky jedné buňky nebo organely. Buňky musí být v suspenzní formě a procházet tak jedna za druhou skrze kapiláru, kterou prochází světlo laseru. Rozptyl světla přímo souvisí se strukturními a morfologickými vlastnostmi buňky, kdežto fluorescence je přímo úměrná počtu daných částic. [90]

3.3.3.1 Analýza buněčného cyklu

V průběhu analýzy je zaznamenáváno množství DNA, které se během buněčného cyklu mění. Před buněčným dělením je množství DNA rovno $2n$, v G_2 -fázi, stejně jako na začátku mitózy (M), je toto množství dvojnásobné. Pokud je tedy buňka ve fázi G_2/M , je množství DNA dvojnásobné a také se to projeví na histogramu získaném průtokovou cytometrií. Histogram je charakterizován závislostí mezi počtem buněk a množstvím DNA. [91]

Pro analýzu buněčného cyklu bylo pracováno v místech vyhrazených pro práci s tkáňovými kulturami, v laminárním boxu a po celou dobu práce bylo pracováno v laboratorním plášti a v rukavicích bez pudru. První den experimentu bylo aplikováno potřebné množství buněk do 6jamkové destičky, v tomto případě 500 000 buněk na jednu jamku. Objem jedné jamky činil vždy celkem 2,5 ml.

Buňky byly „sklizeny“ způsobem uvedeným v kapitole 1.4.1. Nasazeno bylo 500 000 buněk/ml. Na destičku bylo vždy aplikováno 2 ml média a 0,5 ml buněčné suspenze. Destička byla vložena do CO_2 -inkubátoru a inkubována 18 hodin. Po této době bylo z každé jamky odebráno veškeré médium a bylo přidáno nové, již s určitou koncentrací taxanu. Vedle tohoto stanovení byly vždy použity i jamky kontrolní, kam bylo přidáváno pouze čisté médium. Použité koncentrace taxanů byly 20, 50, 100, 300 nM (50 nM koncentrace nebyla použita pro SB-T-1214 a SB-T-1216). Po výměně média byly destičky opět vloženy do CO_2 -inkubátoru a po 24 hodinách byly buňky „sklizeny“.

„Sklízení“ buněk probíhalo mimo laminární box, na vyhrazeném čistém místě. Po celou dobu „sklízení“ byly centrifugační zkumavky, do kterých bylo odebíráno médium i s buňkami, umístěny „na ledu“. Buňkám bylo odebráno médium do předem označených

centrifugačních zkumavek a byly uvolněny trypsinem a přeneseny do původního média. Následně byly centrifugovány při 1700 otáčkách po dobu 10 minut a při 4 °C (centrifuga Z 323 K). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a k peletě byl přidán 1 ml ledového PBS („Phosphate buffered saline“), peleta byla suspendována a vzorek byl za stejných podmínek znovu centrifugován. Tento krok se opakoval ještě jednou. V dalším kroku nebyl supernatant odebrán všechen, ale ve zkumavkách bylo ponecháno cca 100 µl a v tomto objemu byla suspendována peleta. Do každé zkumavky byl přidán 1 ml ledového 70% ethanolu (ředěno z čistého ethanolu). Takto fixované buňky byly uchovány v lednici při 4 °C minimálně přes noc.

Před analýzou byly fixované buňky centrifugovány při 2000 otáčkách po dobu 15 minut při 4 °C. Supernatant byl odebrán a peleta byla suspendována v 1 ml PBS a buňky byly znovu centrifugovány stejným způsobem. Poté bylo promytí PBS ještě jednou zopakováno. Následně byl odebrán supernatant tak, aby ve zkumavce zbylo zhruba 100 µl supernatantu, peleta byla suspendována a bylo přidáno 100-200 µl Wildanova roztoku (50 ml NFW – „nuclease free water“; 0,5 ml TRIS, pH 8; 50 µl RNasy; 30 mg NaCl; 2,5 ml propidium jodidu). Suspenze byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci byla suspenze krátce promíchána na vortexu a analyzována průtokovým cytometrem.

K měření buněčného cyklu byl využit přístroj FACSVersa. Před samotným měřením dle přednastaveného programu byl přístroj kalibrován komerčně dostupnými polystyrenovými kuličkami (FACSuite CS&T Research Beads). Výsledky měření byly vyhodnoceny v programu Becton Dickinson FACSuite.

3.4 Metody použité při práci s klinickými vzorky pacientek

3.4.1 Vzorky a informovaný souhlas pacientek

V předkládané práci byl použit biologický materiál celkem 152 pacientek, kterým byl diagnostikován epitelální ovariální karcinom. Vzorky nádorové tkáně byly získány z Fakultní nemocnice Motol v rámci operace. Celkem byly k dispozici vzorky od 24 pacientek po neoadjuvantní léčbě a 82 pacientek před adjuvantní léčbou. Jako kontrolní tkáň bylo použito 15 vzorků odebraných pacientkám v rámci operace pro jiný než maligní nádor (např. ovariální cysta). Tyto vzorky byly vyšetřeny patologem a pouze vzorky bez obsahu nádorových buněk byly použity do studie. Další biologický materiál byl od pacientek

z Fakultní nemocnice v Plzni, kde bylo využito celkem 47 vzorků pacientek, z nichž 16 podstoupilo neoadjuvantní léčbu, 27 adjuvantní léčbu a 1 vzorek tkáně byl zařazen jako kontrolní. Od všech pacientek, s jejichž biologickým materiálem bylo pracováno, byl získán písemně doložený souhlas se zařazením do studie ve shodě s Helsinskou deklarací. Protokol studie byl schválen Etickou komisí SZÚ v Praze.

3.4.2 Izolace nukleových kyselin a proteinu

Pro izolaci nukleových kyselin a proteinu z nádorové a kontrolní tkáně byl použit komerčně dostupný kit AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN). Kit je navržen tak, aby ze vzorku tkáně nebo i jediné buňky bylo dosaženo maximálního výtěžku DNA, RNA i proteinu. Izolaci nukleových kyselin a proteinu provedla dle instrukcí manuálu AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Handbook [92] Mgr. Kateřina Elsnerová (Oddělení toxikogenomiky, SZÚ Praha). V rámci předkládané práce byly následně použity vzorky RNA uchovávané při -80 °C.

3.4.3 Měření koncentrace a kvality RNA

K měření koncentrace RNA byl využit komerčně dostupný kit: Quant-iT[™] RiboGreen[®] RNA Reagent Kit využívající k měření koncentrace RNA fluorescenční barvu RiboGreen. Měření koncentrace prováděla Mgr. Kateřina Elsnerová (Oddělení toxikogenomiky, SZÚ Praha). Posouzení kvality jednotlivých vzorků RNA bylo provedeno Mgr. Elou Ceroovskou (Oddělení toxikogenomiky, SZÚ Praha). [93, 94] Kontrola kvality RNA byla měřena na základě hodnoty RIN (RNA integrity number), unikátního algoritmu firmy Agilent Technologies. K měření byl použit komerční kit – Agilent RNA 6000 Nano Kit a přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer fungující na principu kapilární elektroforézy. Uvedený kit umožňuje rychlou kontrolu kvality vzorků před dalším využitím. V předkládané diplomové práci byly využity takto připravené vzorky nádorové RNA a stejným způsobem připravené RNA z kontrolní ovariální tkáně.

3.4.4 Syntéza cDNA

Metoda syntézy komplementární DNA (cDNA) využívá náhodných primerů – hexamerů, které nasedají na RNA, jakožto startéry reakce. Reversní transkriptasa podél vlákna RNA syntetizuje vlákno nové, komplementární k původnímu vláknu.

Syntéza cDNA byla prováděna v laminárním boxu za použití rukavic bez pudru a bylo pracováno v laboratorním plášti opět se sterilními pomůckami. Syntéza cDNA probíhala za použití kitu „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ a každý vzorek byl ředěn tak, aby obsahoval 0,5 µg RNA a objem ředěné RNA byl 13 µl. K ředění byla použita voda bez nukleas („nuclease free water“ – NFW). Následně byl do každé zkumavky přidán 1 µl primerů sestávajících se z náhodně syntetizovaných hexamerů („Random Hexamer“). Vzorky byly promíchány lehkým poklepem a centrifugovány na mikrocetrfuze. Dále byly inkubovány v termobloku po dobu 5 minut při 70 °C. Ke každému vzorku bylo přidáno 7 µl „mixu“, který obsahoval:

- 4 µl 5×pufu
- 2 µl 10mM dNTPs (směs nukleotidů)
- 1 µl RNase inhibitoru (20 U/µl).

Vzorky byly promíchány, centrifugovány na mikrocetrfuze a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byly ochlazeny v mrazicím stojánku a centrifugovány na mikrocetrfuze. Z každého vzorku byly odebrány 2 µl jako kontrola a poté byl přidán 1 µl reversní transkriptasy (200U/µl) a vzorky byly ponechány 10 minut při 25 °C a následně umístěny do termobloku se 42 °C na 1 hodinu. Po proběhlé transkripci byla reakce ukončena inkubací 10 minut při 70 °C v termobloku. Vzorky cDNA byly uchovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

3.4.5 Amplifikace cDNA a horizontální agarosová elektroforéza

Kvalita získané cDNA a případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena amplifikací fragmentu kontrolního genu ubiquitinu C (*UBI*) za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1009 bp) pomocí polymerázové řetězové reakce. [95] Po celou dobu práce bylo pracováno se sterilními pomůckami. K reakci byla využita destička s 96 jamkami a do každé bylo pipetováno 0,5 µl cDNA a 9,5 µl směsi, která pro každý vzorek obsahovala:

- 6,9 µl NFW
- 2 µl 5×HOT FIREPol Master Mix RTL
- 0,3 µl „forward“ 10mM *UBI* primer
- 0,3 µl „reverse“ 10mM *UBI* primer.

Amplifikace proběhla v cykleru (Gene Amp9700 PCR System), kde byl nastaven následující teplotní program:

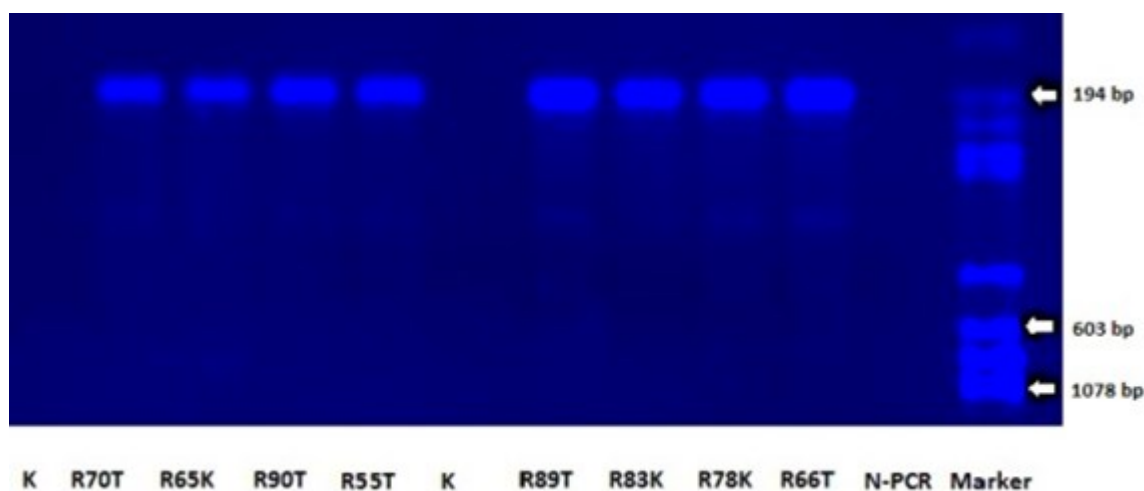
- 5 minut při 94 °C
a následovalo 38 cyklů:
 - 30 s 94 °C
 - 30 s 64 °C
 - 30 s 72 °C
- 5 minut při 72 °C
- v posledním kroku bylo nastaveno 10 °C, do vypnutí přístroje.

Produkt polymerázové řetězové reakce byl veškerý využit k elektroforetické separaci.

Elektroforéza je metoda, která je využívána k separaci biomolekul. Agarosa vytváří strukturu, kterou je schopna biomolekula „projít“. Molekula DNA má záporný náboj díky fosfátovým zbytkům na nukleotidech, putuje ke kladně nabitě elektrodě – anodě. K vizualizaci a vyhodnocení elektroforeogramu bylo využito ethidium bromidu.

Po celou dobu bylo pracováno v laboratorním plášti a byly použity rukavice bez pudru. K přípravě gelu byl využit pufr TBE (tris-borát-EDTA). Agarosový gel byl připraven 3% (w/v) rozpuštěním agarosy v pufru TBE v mikrovlnné troubě.

Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické aparatury. Do žlábků v gelu bylo pipetováno 10 µl vzorku nebo 8 µl markeru ϕ 174 DNA – Hae III Digest. Elektroforéza probíhala zhruba 25 minut při 120 V (~100 mA), následně byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu, opláchnut v destilované vodě a vyfotografován (Odyssey® Fc Imaging System). Příklad agarosového gelu po elektroforéze je uveden na Obr. 9 na str. 33.



Obr. 9 Výsledek horizontální agarosové elektroforézy. Jako marker byl použit ϕ 174 DNA – Hae III Digest. Vzorek označený jako N-PCR sloužil jako negativní kontrola reakce, K jako kontrola vzorku bez transkriptasy a zbylé byly sledované vzorky.

3.4.6 Stanovení genové exprese pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

Vzorky cDNA byly v předkládané diplomové práci využity ke stanovení exprese vybrané kazety genů signální dráhy Notch (Tab. 5 na str. 34). Pro měření hladiny genové exprese na úrovni transkriptu byla využita kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR). V této reakci je podstatná především – 5' → 3' exonukleasová aktivita DNA polymerasy a fluorescenční značka. V rámci této práce byly využívány qPCR stanovení za použití 5×HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) a TaqMan® Gene Expression Assays, které obsahují páry neznacených primerů a próby s fluorescenční reportérovou značkou (FAM™) na 5' konci a „zhášecem“ na 3' konci. „Próba“ je fragment DNA komplementární k sekvenci transkriptu měřeného genu mezi oběma primery. V přítomnosti „zhášече“ nelze detekovat fluorescenční signál, během amplifikace úseku cDNA s navázanou sondou však dochází k její degradaci vlivem 5' → 3' exonukleasové aktivity DNA polymerasy HOT FIREPol® obsažené v reakční směsi, a jakmile se reportérová značka dostane z dosahu „zhášече“, lze detekovat fluorescenční signál. Množství amplifikované cDNA koresponduje s intenzitou signálu a průběh reakce lze sledovat v reálném čase.

Tab. 4 Přehled a informace o studovaných kontrolních genech

Kontrol-ní geny	Číslo TaqMan Assay	Anglický název genu	Délka ampliko-nu (bp)	Transkript RefSeq*
PPIA	Hs99999904_m1	peptidylprolyl isomerase A	98	NM_001300981.1
UBC	Hs00824723_m1	ubiquitin C	71	NM_021009.6
YWHAZ	Hs03044281_g1	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, ζ polypeptide	106	NM_001135700.1

Tab. 5 Přehled a informace o studovaných cílových genech

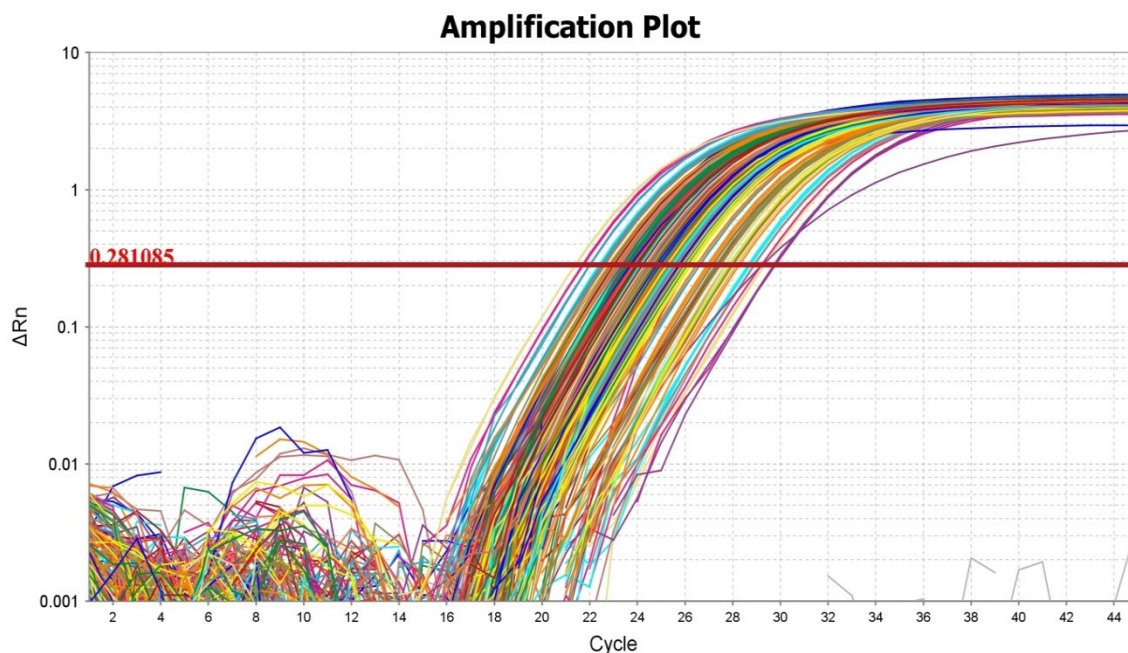
Cílové geny	Číslo TaqMan Assay	Anglický název genu	Délka am-plikonu (bp)	Transkript RefSeq*
NOTCH1	Hs01062014_m1	notch1	80	NM_017617.4
NOTCH2	Hs01050702_m1	notch2	60	NM_001200001.1
NOTCH3	Hs01128537_m1	notch3	68	NM_000435.2
NOTCH4	Hs00965921_m1	notch4	88	NM_004557.3
JAG1	Hs01070032_m1	jagged 1	72	NM_000214.2
JAG2	Hs00171432_m1	jagged 2	110	NM_002226.4
DLL1	Hs00194509_m1	delta like canonical Notch ligand 1	74	NM_005618.3
DLL4	Hs00184092_m1	delta like canonical Notch ligand 4	78	NM_019074.3
HES1	Hs00172878_m1	hes family bHLH transcription factor 1	78	NM_005524.3
CNTN1	Hs00355024_m1	contactin 1	64	NM_001256063.1

Vzorky cDNA byly nejprve 8× ředěny NFW. Dále bylo připraveno požadované množství směsi pro každý sledovaný gen (Tab. 4 a Tab. 5 na str. 34). Do destičky s 384 jamkami byly pipetovány vždy 2 µl 8 × ředěné cDNA a 3 µl směsi o složení:

- 1,75 µl NFW
- 1 µl 5× Hot FirePol Probe qPCR Mix Plus (ROX)
- 0,25 µl TaqMan® Gene Expression Assay (20×).

Celou práci nanášení vzorků velmi usnadnila pomocná pipetovací destička Trackman™. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 1500 otáčkách při laboratorní teplotě (Z 360 K). Genová exprese byla stanovena na přístroji Viia7 (viz Obr. 10 na str. 36) a program na ní byl stanoven takto:

- 2 minuty 50 °C
- 10 minut 95 °C
- 45 cyklů:
 - 15 s 95 °C
 - 1 minuta 60 °C (geny PPIA, UBC, YWHAZ, NOTCH4, JAG1, JAG2, DLL1, HES1, CDON, HRAS) nebo 58 °C (geny NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, DLL4, CNTN1).



Obr. 10 qPCR, (Příklad amplifikační křivky qPCR pro gen NOTCH3. Na ose X jsou uvedené cykly PCR, na ose Y měřená intenzita fluorescence v relativních jednotkách (r.u.). Hodnota C_q odpovídá cyklu reakce, ve kterém intenzita fluorescence stoupne nad prahovou hodnotu vypočtenou softwarem qPCR-systému ViiA7.

Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech. V případě rozdílu většího než 0,5 cyklu mezi duplikáty bylo stanovení opakováno tak dlouho, dokud tento rozdíl nebyl menší než 0,5 cyklu. Spolu se vzorky byl vždy měřen také kalibrátor (8× ředěná ekvimolární směs 10 vzorků cDNA ze zdravých kontrolních tkání) pro kontrolu průběhu reakce a negativní kontrola obsahující NFW místo cDNA.

3.4.7 Statistické vyhodnocení polymerázové řetězové reakce v reálném čase

Zjištěné hodnoty hladiny exprese sledovaných kandidátních genů byly před statistickou analýzou nejprve normalizovány pomocí hladin referenčních genů dle následujícího vzorce:

$$C_q \text{ (normalizované)} = C_q \text{ (vzorek)} / C_q \text{ (průměr referenčních genů)} \quad (1)$$

3.4.8 Statistické hodnocení genové exprese v souvislosti s klinicko-patologickými daty pacientek

Pro statistické hodnocení významu exprese studovaných genů v prognóze a predikci výsledku terapie pacientek s ovariálním karcinomem byla spolu s biologickým materiálem získávána také klinická data pacientek. Jednalo se o následující informace: věk pacientky v době diagnózy, histologický typ ovariálního karcinomu, stádium onemocnění, stupeň diferenciacie, exprese markeru Ki67 (%) a doba přežívání od operace do progresu, relapsu, nebo úmrtí v měsících tzv. Time to Progression (TTP). Po hodnocení vztahu exprese genů dráhy Notch k histologickému typu byly pacientky rozděleny na skupiny s High Grade Serosním typem (HGSC) vs. ostatní typy, stupněm diferenciacie G3 vs. G1 nebo G2 a stádiem I nebo II vs. III nebo IV. Expres proliferačního markeru Ki67 byla stanovena imunohistochemicky a srovnávána přímo s expresními hladinami. Všechny souvislosti genové exprese s klinickými daty a přežíváním byly hodnoceny pomocí programu SPSS v16.0 (Inc., Chicago, IL – USA), a to postupem uvedeným v diplomové práci Ely Cerovské [93] za využití neparametrických testů Mann-Whitney a Kruskal-Wallis pro expresní data a faktoriální veličiny a Spearmanova testu pro kontinuální veličiny. Přežívání bylo hodnoceno Kaplan-Meierovou metodou a Log Rank testem, jejichž vstupem byly hodnoty exprese rozdělené dle mediánu a doba do progresu. Významnost byla hodnocena na hladině 0,05; výsledky s hladinou významnosti $p < 0,05$ byly považovány za významné.

Výsledky statistických analýz ze softwaru SPSS v16.0 (stage, grade, exprese Ki67) byly podrobeny tzv. FDR (false discovery rate) korekci dle (Benjamini and Hochberg, 1995) (dále B-H korekce). Pro B-H korekci jsou zapotřebí všechny p-hodnoty pro daný typ analýz seřazené vzestupně dle velikosti a významnost je stanovena na hladině $q = 0,05$. Vlastní korekce je provedena s použitím následujícího vzorce:

$$P_i \leq (i / m) \cdot q \quad (2)$$

Hodnota m představuje celkový počet hypotéz a i pořadí hypotézy v tabulce. Pokud je p-hodnota menší než výsledná hodnota q , je statistický výsledek i po korekci považován za signifikantní (Benjamini and Hochberg, 1995).

Všechny metody použité při práci s klinickými vzorky pacientek jsou na Oddělení toxikogenomiky již zavedené, optimalizované a jejich využití bylo publikováno. [93, 94, 96]

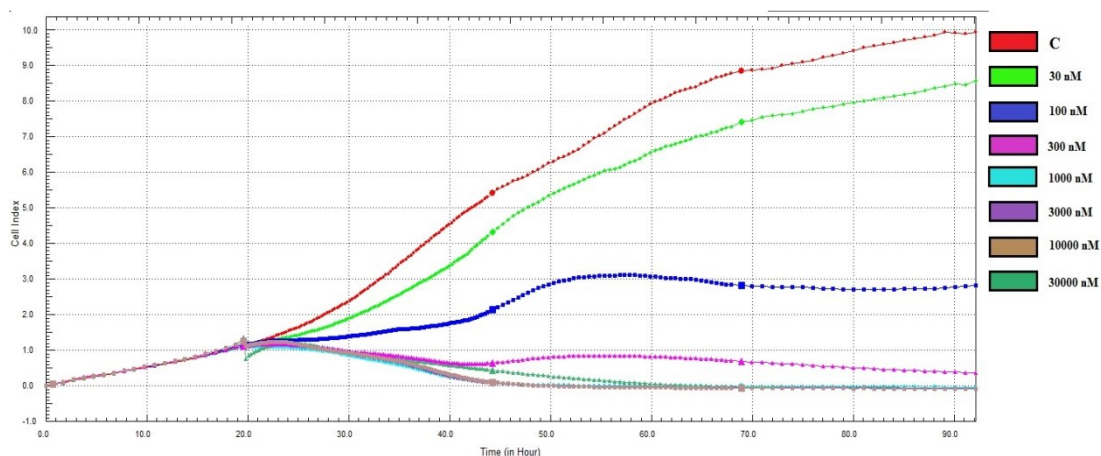
4 Výsledky

4.1 Výsledky části studie *in vitro*

V experimentální části *in vitro* byla studována účinnost nových derivátů taxanů (SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) v nádorových buněčných liniích vaječníků NCI/ADR-RES, rezistentních vůči paclitaxelu. Cílem experimentu bylo porovnat účinky konvenčního taxanu paclitaxelu s taxany SB-T-1214 a SB-T-1216, od kterých jsou nové deriváty odvozeny.

4.1.1 Cytotoxicita paclitaxelu a nových taxanů stanovená pomocí přístroje xCELLigence RTCA DP

Pro zjištění cytotoxicity a stanovení hodnoty IC_{50} studovaných taxanů v ovariální nádorové linii bylo využito přístroje xCELLigence RTCA DP (postup viz kapitola 3.3.2) umožňujícího monitorování cytotoxicity látek v reálném čase. Stanovení bylo pro každý ze sledovaných taxanových derivátů provedeno v duplikátech, kde byla zaznamenávána buněčná odpověď po dobu 72 hodin od aplikace taxanu. Rozsah studovaných koncentrací taxanů byl 10 – 30 000 nM. Analýza dat byla provedena v programu RTCA v. 2.0 (ACEA Biosciences Inc.), ve kterém byly růstové křivky buněk s přidaným taxanem normalizovány vzhledem ke kontrole (bez přidaného taxanu) a času, přičemž z duplikátů už byly přímo programem vyhodnoceny průměrné hodnoty IC_{50} (Obr. 11, na str. 39).



Obr. 11 Záznam „snímání“ hodnoty CI („Cell Index“) v reálném čase z přístroje xCELLigence. Jedná se o buněčnou linii NCI/ADR-RES, ke které byly po 18 hodinách přidány různé koncentrace (30, 100, 300, 1000, 3000, 10 000, 30 000 nM) taxanu SB-T-121602. Na ose X je uveden čas v hodinách a na ose Y hodnota Cell Indexu.

V Tab. 6 jsou shrnuty zjištěné hodnoty IC_{50} v ovariální nádorové linii NCI/ADR-RES z časového „snímání“ po dobu 72 hodin od aplikace taxanových derivátů (SB-T-1214, SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) a paclitaxelu spolu s koeficientem determinace (R^2).

Tab. 6 Průměrné hodnoty IC_{50} testovaných taxanů v ovariální nádorové buněčné linii NCI/ADR-RES po aplikaci taxanů a taxanových derivátů spolu s koeficientem determinace. Parentální látky jsou zvýrazněny.

Taxany	NCI/ADR-RES buněčná linie	
	IC_{50} (0-72h) [nM]	R^2
<i>Paclitaxel</i>	961,1	0,871
SB-T-1214	92,4	0,979
SB-T-121402	17,0	0,804
SB-T-121405	190,7	0,988
SB-T-121406	34,9	0,958
SB-T-1216	100,8	0,980

Taxany	NCI/ADR-RES buněčná linie	
	IC ₅₀ (0-72h) [nM]	R ²
SB-T-121602	37,8	0,964
SB-T-121605	14,4	0,747
SB-T-121606	17,3	0,810

Z výsledků uvedených v Tab. 6 vyplývá, že všechny taxany a nové taxanové deriváty jsou v rezistentních buněčných liniích karcinomu ovaria (NCI/ADR-RES) výrazně, a to až 50×, účinnější než samotný paclitaxel. Navíc jsou nové struktury taxanů tzv. III. generace v rezistentních nádorových buňkách účinnější než parentální látky SB-T-1214 a SB-T-1216, od kterých jsou odvozeny. Jedinou výjimkou je derivát SB-T-121405, který z taxanů III. generace ukázal nejnižší účinek. Na základě těchto dat byly vybrány nejslibnější deriváty z řady nových taxanů (**SB-T-121402**, **SB-T-121605** a **SB-T-121606**) pro sledování jejich vlivu na buněčný cyklus v buňkách NCI/ADR-RES.

4.1.2 Vliv paclitaxelu a nových taxanů na buněčný cyklus v rezistentních nádorových buňkách vaječníků

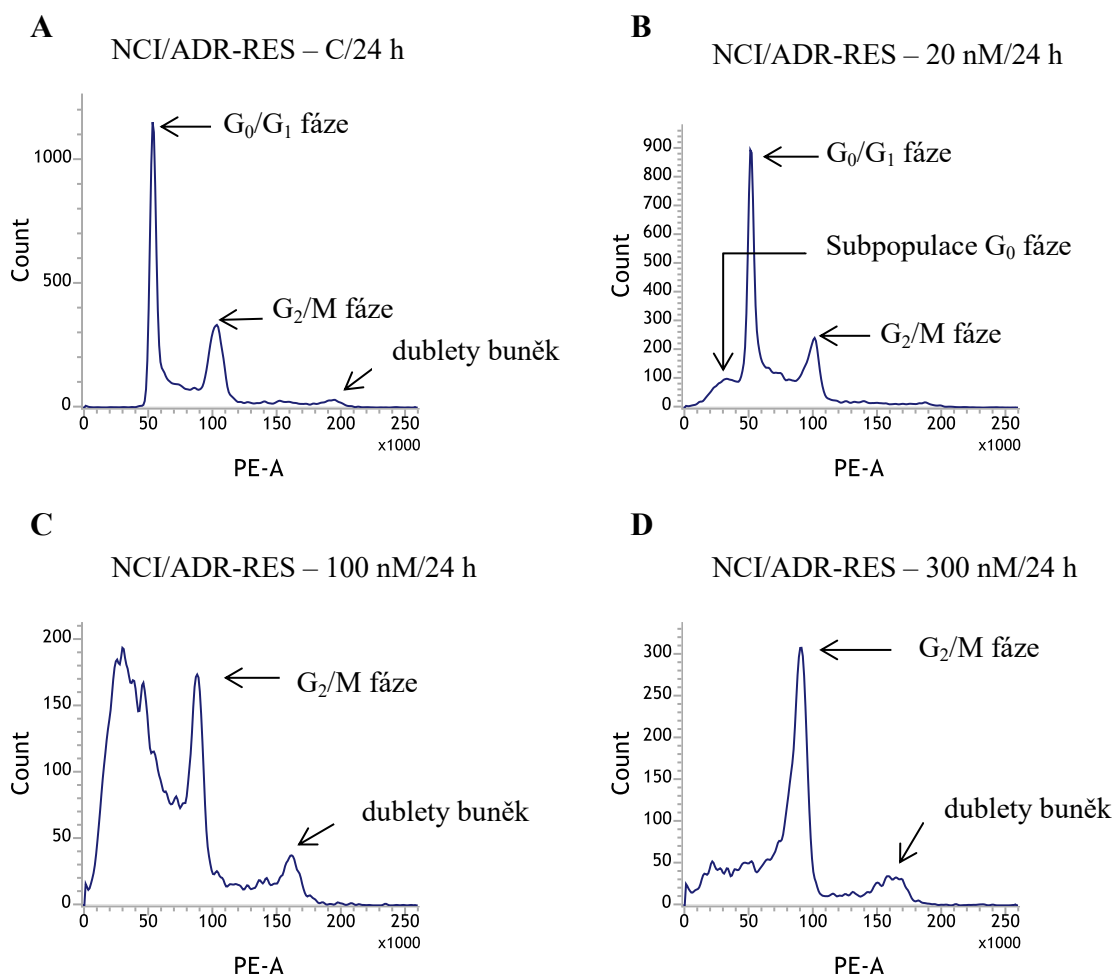
Vliv cytostatik na nádorové buňky lze monitorovat měřením změn v regulaci buněčného cyklu. K analýze lze využít fluorescenční barvivo propidium jodid. Toto barvivo se naváže na molekulu DNA v případě, že je poškozená buněčná membrána a barvivo může volně proniknout k jádru. Množství navázaného barviva je přímo úměrné množství DNA v buňce. Barvení tak umožní nejen zaznamenání obsahu DNA, ale i stanovení procentuálního zastoupení buněk v různých fázích buněčného cyklu. Zároveň barvení DNA poskytne i informace o podílu mrtvých (apoptických) buněk nacházejících se v tzv. sub G₀-fázi a to díky tomu, že během apoptózy, v důsledku činnosti endonukleas, dochází ke vzniku fragmentů DNA o nízké molekulové hmotnosti. Postup stanovení je uveden v kapitole 3.3.3.1, na str. 28.

V předkládané diplomové práci byl sledován vliv rostoucích koncentrací (20-3000 nM) taxanových derivátů SB-T-1214 a SB-T-1216 a jejich substituovaných derivátů SB-T-121402, SB-T-121605, SB-T-121606 na buněčný cyklus v rezistentních nádorových

buňkách vaječníků NCI/ADR-RES. Pro sledování buněčného cyklu byly nádorové buňky inkubovány se studovanými taxany po dobu 24 hodin. Všechny analýzy byly prováděny opakovaně v rámci nezávislých měření, přičemž byl vždy pozorován stejný trend ovlivnění buněčného cyklu po aplikaci nových taxanů. Na obrázcích znázorňujících distribuci buněčného cyklu jsou znázorněny reprezentativní histogramy vybraných 3 koncentrací každého taxanu vycházejících jednak ze zjištěných hodnot IC_{50} (~20 nM) v NCI/ADR-RES buňkách a jednak z předchozích měření Oddělení toxikogenomiky (SZÚ) s taxany SB-T-1214 a SB-T-1216 (100 nM a 300 nM), které v buňkách způsobovaly čistý a kompletní blok ve fázi G_2/M . Analýza buněčných populací byla provedena pomocí přístroje FACS Versa.

Nejprve byly analyzovány změny buněčného cyklu po aplikaci SB-T-1214 v NCI/ADR-RES buňkách. Histogram znázorňující zjištěný počet buněk vůči množství DNA tzn. distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu je uveden na Obr. 12 na str. 42. Buňky v G_0/G_1 -fázi buněčného cyklu jsou nejvíce zastoupeny v oblasti 50 PE-A. V oblasti okolo 100 PE-A jsou buňky v G_2/M -fázi a mezi nimi se nachází buňky v S-fázi. Část histogramu v oblasti 150 - 200 PE-A představuje dublety buněk, které vznikají jako zbytek po suspendování buněk před aplikací propidium jodidu.

SB-T-1214



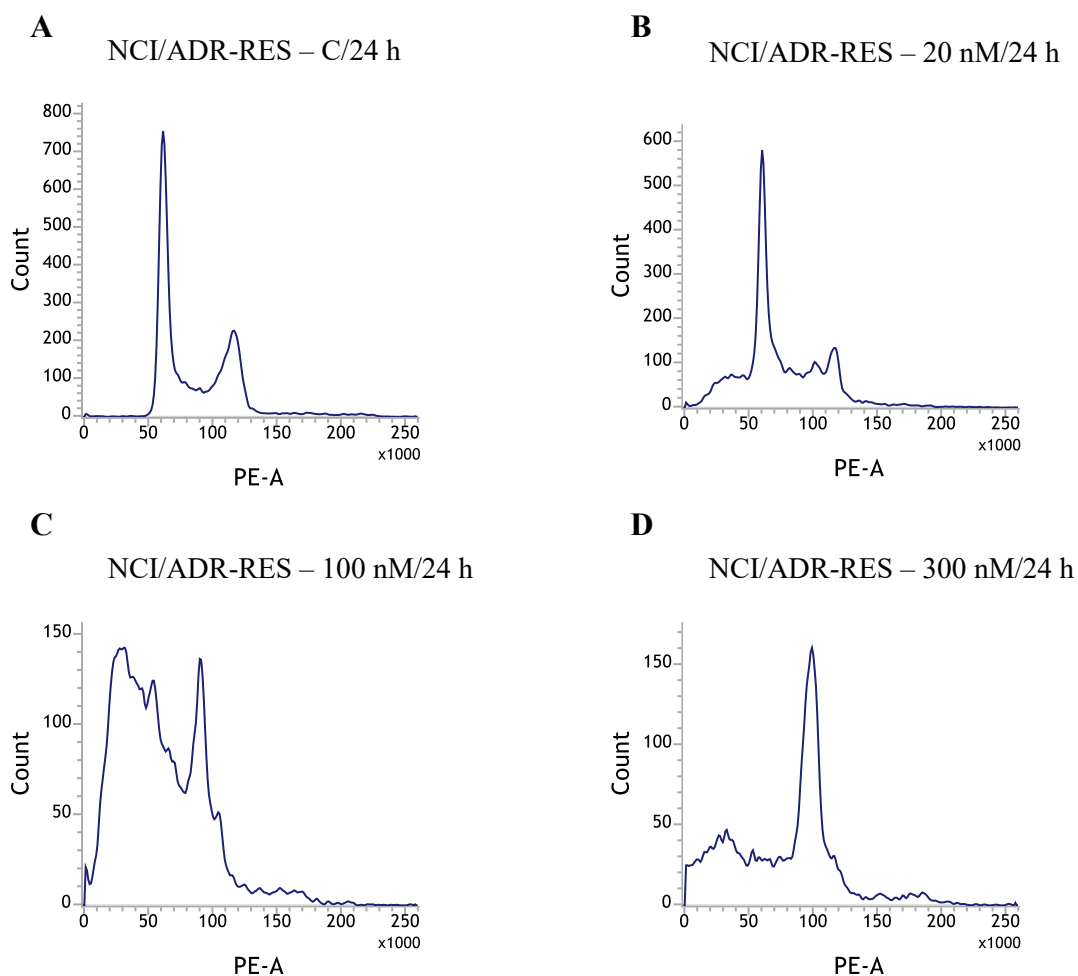
	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	Subpopulace G ₀ [%]
C Σ 83,98%	38,35	12,11	24,00	0,19
20 nM Σ 85,38%	33,28	12,88	20,52	9,57
100 nM Σ 63,10%	12,70	10,40	12,44	21,04
300 nM Σ 46,43%	4,08	5,14	23,25	4,99

Obr. 12 Znáznornění jednotlivých fází buněčného cyklu a jejich procentuální zastoupení v buněčné linii NCI/ADR-RES inkubované s příslušnou koncentrací taxanu po dobu 24 hodin. Kontrolní linie inkubované s kultivačním médiem (A), linie inkubované s 20 nM SB-T-1214 (B), linie inkubované se 100 nM SB-T-1214 (C), linie inkubované s 300 nM SB-T-1214 (D). Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Výsledky byly analyzovány programem Becton Dickinson FACSuite.

Z výsledků je patrné, že v buňkách kontrolních (inkubovaných bez taxanu) je nejvyšší počet buněk zastoupen v G_0/G_1 -fázi (PE-A 50), Obr. 12. Při použití 20 nM koncentrace taxanu je v části B vidět malé množství buněk v subpopulaci G_0 -fáze a celkový počet buněk v G_1 -fázi se zmenšil. V části C, po inkubaci buněk s vyšší koncentrací – 100 nM SB-T-1214 vede k akumulaci buněk v G_0 -fázi a dále v G_2/M -fázi, čili buňky jsou před samotným dělením. Aplikace 300 nM koncentrace taxanu, Obr. 11 D měla za následek přednostně akumulaci buněk ve fázi G_2/M , viditelné jsou i zbytkové dublety. Z Obr. 12 je patrné, že jako velmi účinné lze označit koncentrace 100 i 300 nM, které významně indukují vstup buněk do subpopulace G_0 -fáze a významně indukují vstup do G_2/M -fáze, a tak výrazně mění distribuci jednotlivých fází buněčného cyklu.

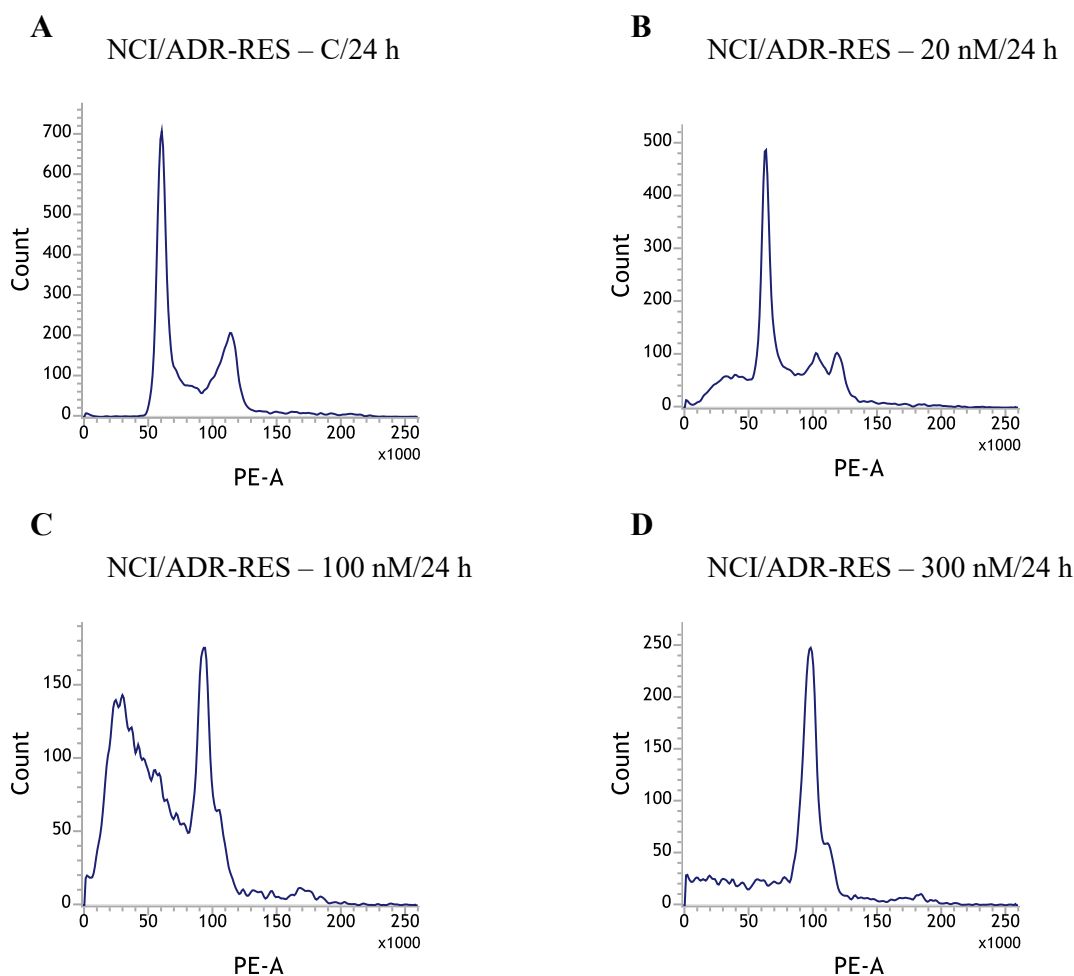
Dále byl stejným způsobem měřen vliv derivátu SB-T-121402 na buněčný cyklus v NCI/ADR-RES buňkách. Od derivátu SB-T-1214 se liší v postranním řetězci, ve kterém má navíc methylový zbytek. Histogram znázorňující zjištěný počet buněk vůči množství DNA je uveden na Obr. 13 na str. 44.

Z Obr. 13 na str. 44 je patrné, že působením SB-T-121402 dochází k velmi podobnému efektu jako v případě SB-T-1214, účinek je srovnatelný. Stejným způsobem byl měřen vliv taxanů SB-T-1216, SB-T-121605 a SB-T-121606 na buněčný cyklus v NCI/ADR-RES buněčné linii, jak je znázorněno na Obr. 14 na str. 45, Obr. 15 na str. 46 a Obr. 16 na str. 47.

SB-T-121402

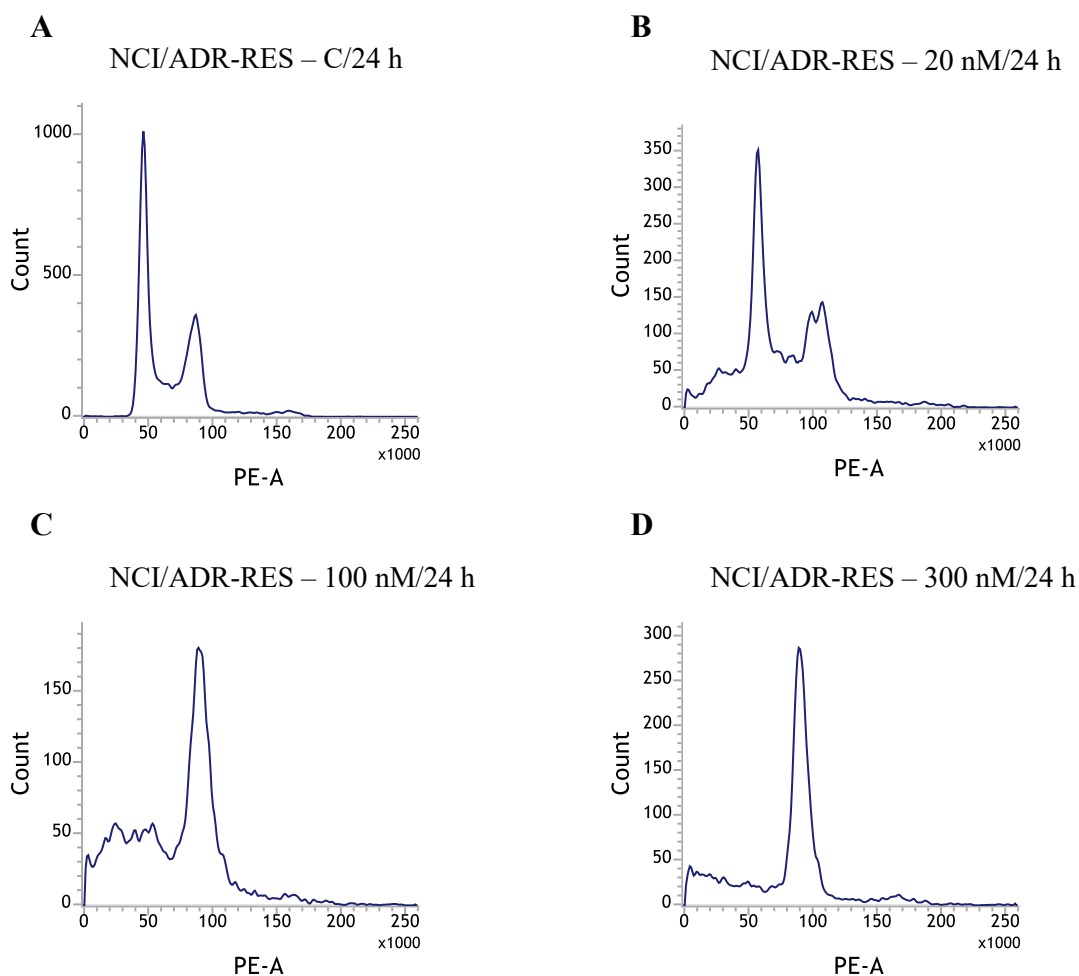
	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	Subpopulace G ₀ [%]
C Σ 69,34 %	33,92	9,70	21,93	0,16
20 nM Σ 65,64 %	28,66	8,20	14,18	7,56
100 nM Σ 51,81 %	12,33	6,22	14,16	15,96
300 nM Σ 29,92 %	3,21	2,40	14,76	5,28

Obr. 13 Znázornění jednotlivých fází buněčného cyklu a jejich procentuální zastoupení v buněčné linii NCI/ADR-RES inkubované s příslušnou koncentrací taxanu po dobu 24 hodin. Kontrolní linie inkubované s kultivačním médiem (A), linie inkubované s 20 nM SB-T-121402 (B), linie inkubované se 100 nM SB-T-121402 (C), linie inkubované s 300 nM SB-T-121402 (D). Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Výsledky byly analyzovány programem Becton Dickinson FACSuite.

SB-T-1216

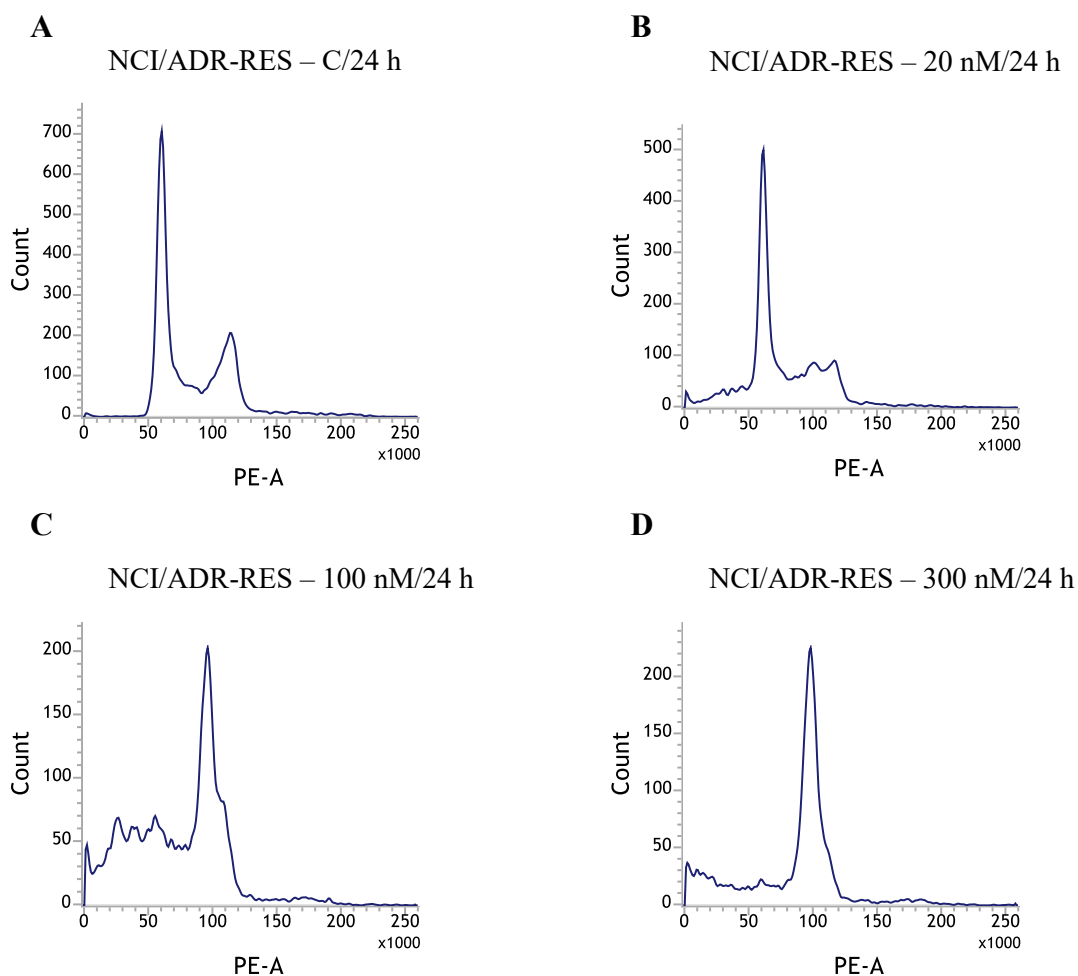
	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	Subpopulace G ₀ [%]
C				
Σ67,50 %	34,80	7,26	19,98	0,12
20 nM				
Σ57,71 %	26,13	5,73	13,69	7,74
100 nM				
Σ 51,52%	11,30	4,76	15,28	15,54
300 nM				
Σ32,25 %	2,59	1,73	20,12	3,44

Obr. 14 Znáznornění jednotlivých fází buněčného cyklu a jejich procentuální zastoupení v buněčné linii NCI/ADR-RES inkubované s příslušnou koncentrací taxanu po dobu 24 hodin. Kontrolní linie inkubované s kultivačním médiem (A), linie inkubované s 20 nM SB-T-1216 (B), linie inkubované se 100 nM SB-T-1216 (C), linie inkubované s 300 nM SB-T-1216 (D). Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Výsledky měření pocházejí z programu Becton Dickinson FACSuite.

SB-T-121605

	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	Subpopulace G ₀ [%]
C Σ84,77 %	43,44	8,88	26,01	0,16
20 nM Σ54,12 %	22,26	5,46	16,35	5,37
100 nM Σ36,82%	5,54	3,10	19,25	5,24
300 nM Σ34,13 %	2,43	1,48	22,28	3,38

Obr. 15 Znázornění jednotlivých fází buněčného cyklu a jejich procentuální zastoupení v buněčné linii NCI/ADR-RES inkubované po s příslušnou koncentrací taxanu po dobu 24 hodin. Kontrolní linie inkubované s kultivačním médiem (A), linie inkubované s 20 nM SB-T-121605 (B), linie inkubované se 100 nM SB-T-121605 (C), linie inkubované s 300 nM SB-T-121605 (D). Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Výsledky měření pocházejí z programu Becton Dickinson FACSuite.

SB-T-121606

	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	Subpopulace G ₀ [%]
C				
Σ67,50 %	34,80	7,26	19,98	0,12
20 nM				
Σ50,51 %	26,22	4,51	10,38	4,74
100 nM				
Σ 40,62%	6,51	3,62	18,64	7,12
300 nM				
Σ27,40 %	1,76	1,32	17,66	3,02

Obr. 16 Znázornění jednotlivých fází buněčného cyklu a jejich procentuální zastoupení v buněčné linii NCI/ADR-RES inkubované s příslušnou koncentrací taxanu po dobu 24 hodin. Kontrolní linie inkubované s kultivačním médiem (A), linie inkubované s 20 nM SB-T-121606 (B), linie inkubované se 100 nM SB-T-121606 (C), linie inkubované s 300 nM SB-T-121606 (D). Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Výsledky měření pocházejí z programu Becton Dickinson FACSuite.

Z Obr. 14, Obr. 15 a Obr. 16 je patrné, že dochází k lepšímu efektu než u taxanových derivátů řady SB-T-1214. Aplikace taxanů řady SB-T-1216 vede k akumulaci buněk v G₂/M-fázi buněčného cyklu, a to již při 100 nM koncentraci. Procentuální zastoupení buněk v G₂/M-fázi při 300 nM koncentraci je nejnižší u taxanového derivátu SB-T-121402.

4.2 Studie zabývající se významem signální dráhy Notch u klinických vzorků pacientek s nádory vaječníků

Na Oddělení toxikogenomiky SZÚ v Praze bylo v rámci předchozích, dosud nepublikovaných, studií zjištěno, že aplikace taxanů v ovariálních nádorových buňkách NCI/ADR-RES vede k významné deregulaci genů signální dráhy Notch, zejména receptorů NOTCH3 a NOTCH4. Tato deregulace může být tedy nejen novým mechanismem působení taxanů, ale signální dráha Notch může být rovněž využita jako terapeutický cíl pro léčbu tohoto onemocnění. Ovšem změny exprese a jejich význam přímo ve vzorcích pacientek s ovariálním nádorem nejsou dobře prostudovány, a proto bylo v druhé části předkládané diplomové práce přistoupeno ke studiu genového expresního profilu signální dráhy Notch a jejích hlavních cílových genů u pacientek s nádorem vaječníků. Expres základních genů signální dráhy Notch (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 a DLL4) a jejích cílových genů (HES1 a CNTN1) byla stanovena ve vzorcích primární nádorové tkáně a kontrolní tkáně vaječníků. Byly posuzovány rozdíly mezi genovou expresí v nádorové a kontrolní tkáni vaječníků. Dále byly u pacientek s nádorem vaječníků hodnoceny změny exprese signální dráhy Notch po chemoterapeutické léčbě a v neposlední řadě byly hledány vztahy mezi hladinami exprese signální dráhy Notch a klinicko-patologickými daty pacientek včetně jejich přežívání a výsledků terapie.

4.2.1 Základní charakteristiky sledovaného souboru pacientek

Do studie bylo zařazeno 152 vzorků tkání pacientek, u kterých byl diagnostikován ovariální karcinom a 15 vzorků kontrolní tkáně vaječníků, jak je podrobně specifikováno v kapitole 3.4.1 na str. 29.

Klinicko-patologické charakteristiky pacientek s nádory vaječníků zařazenými ve studii jsou shrnuty v Tab. 7 na str. 49.

Tab. 7 Charakteristiky souboru patientek s nádorem vaječníků (n=152) zařazených do studie genového expresního profilu

Charakteristika		Počet pacientek	Podíl pacientek [%]
Grade onemocnění	GRADE I	10	6,5
	GRADE II	21	14,0
	GRADE III	114	75,0
	Neznámo	7	4,5
FIGO Stadium	STAGE I	13	8,5
	STAGE II	12	8,0
	STAGE III	111	73,0
	STAGE IV	9	6,0
	Neznámo	7	4,5
Histologický typ nádoru	HGSC („high grade serous carcinoma“)	108	71,0
	ostatní	41	27,0
	Neznámo	3	2,0
Vzdálené metastázy	ANO	11	7,0
	NE	111	73,0
	Neznámo	30	20,0
Reziduum po operaci^a	ANO	76	49,5
	NE	70	46,0
	Neznámo	7	4,5
Progrese onemocnění	ANO	70	46,0
	NE	49	32,0

Charakteristika		Počet pacientek	Podíl pacientek [%]
	Nehodnoceno	33	22,0
Rezistence na terapii ^b	Neodpovídající	16	10,5
	Částečně odpovídající	16	10,5
	Odpovídající	70	46,0
	Nehodnoceno	50	33,0
Exprese Ki67 ^c	Známo	78	52,0
	Nehodnoceno	74	48,0
Úmrtí pacientky	ANO	48	32,0
	NE	90	59,0
	Nehodnoceno	14	9,0
Průměrný věk všech pacientek v době diagnostiky: 59,5 ± 11,0 let			

Pozn.: ^aReziduem je míněna přítomnost nádorové tkáně i po operačním výkonu v případech, kdy nebylo možno odstranit v rámci operace celý nádor.

^bU klinické informace označené jako rezistence jsou pacientky rozděleny do tří kategorií: „**neodpovídající**“ označuje rezistentní pacientky vůči chemoterapii, u kterých do 6 měsíců od ukončení léčby došlo k progresi onemocnění; „**částečně odpovídající**“ označuje pacientky, u nichž došlo k progresi onemocnění v rozmezí 6-12 měsíců od ukončení léčby; „**odpovídající**“ pak označuje senzitivní pacientky, u kterých progresie nenastala nebo k ní došlo až po více než 12 měsících od ukončení léčby a stejný typ chemoterapie může být použit k další léčbě.

^cU markeru proliferace Ki67 byla k dispozici data pouze pro pacientky z Fakultní nemocnice v Motole, průměrná hodnota Ki67 byla 36,1 %.

Sledovaný soubor pacientek s ovariálním nádorem měl podobné charakteristiky jako jiné soubory pacientek s tímto onemocněním popisované v literatuře. [102, 103] Zhruba u 70 % pacientek se jednalo o agresivní HGSC typ nádoru, vyššího grade 3 a stadia III-IV. U téměř poloviny pacientek (46 %) došlo po úvodní léčbě k progresi onemocnění, přičemž u

21 % tato progresa nastala do půl roku od ukončení chemoterapeutické léčby. Pacientkám s progresí onemocnění je následně aplikována další chemoterapie, která ovšem v řadě případů má již jen paliativní charakter.

4.2.2 Stanovení genové exprese signální dráhy Notch

Pro stanovení míry genové exprese signální dráhy Notch a jejích cílových genů byla nejprve izolována ze vzorků tkáně pacientek s nádorem vaječníků a z kontrolních vaječníků RNA. V dalším kroku byla izolovaná RNA přepsána na cDNA reverzní transkripcí. Stanovení a analýza genové exprese byly provedeny metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase na přístroji ViiA7. Získané hodnoty expresí Ct všech sledovaných genů včetně třech kontrolních (PPIA, UBC a YWHAZ) jsou uvedeny v **Příloze I**. Exprese byla normalizována vůči kontrolním genům postupem uvedeným v kapitole 3.4.7 na str. 36. K analýze dat a jejich statistickému hodnocení byl využit program SPSS v 16.0.

Všechny sledované geny (NOTCH1-4, JAG1-2, DLL1, DLL4, HES1, CNTN1), kromě DLL3 ligandu, byly v ovariální tkáni exprimovány. Nejvíce byl exprimován NOTCH3 gen, následovaný genem ligandu JAG1, geny pro receptory NOTCH1 a NOTCH2 a ostatními sledovanými geny. Exprese jednotlivých genů signální dráhy Notch spolu navzájem velmi významně korelovala, jak bylo zjištěno Spearmanovým testem v programu SPSS, viz Tab. 8 na str. 52, a hodnota významnosti (p-hodnota) byla vždy menší než 0,001 kromě korelace mezi geny JAG2 a CNTN1, kde byla hodnota $p = 0,723$.

Tab. 8 Korelační koeficienty vztahů mezi expresí jednotlivých genů signální dráhy Notch ve vzorcích ovariální nádorové tkáně (n=152)

	CNTN1	HES1	DLL4	DLL1	JAG2	JAG1	NOTCH4	NOTCH3	NOTCH2
NOTCH1 ρ	0,262	0,564	0,674	0,622	0,515	0,662	0,716	0,625	0,416
NOTCH2 ρ	0,481	0,381	0,555	0,501	0,281	0,413	0,555	0,532	
NOTCH3 ρ	0,267	0,420	0,632	0,481	0,417	0,566	0,633		
NOTCH4 ρ	0,332	0,533	0,919	0,583	0,434	0,577			
JAG1 ρ	0,333	0,660	0,530	0,523	0,400				
JAG2 ρ	0,029	0,220	0,398	0,277					
DLL1 ρ	0,494	0,636	0,567						
DLL4 ρ	0,325	0,576							
HES1 ρ	0,493								

Pozn. ρ = korelační koeficient

Hodnota významnosti (p-hodnota) byla vždy menší než 0,001 kromě korelace mezi geny JAG2 a CNTN1, kde byla hodnota $p = 0,723$.

4.2.3 Porovnání genové exprese v primárních nádorech a kontrolní tkáni vaječníků

U všech sledovaných genů bylo provedeno porovnání hladiny jejich exprese v primárních ovariálních nádorech a v kontrolní ovariální tkáni. U genů NOTCH1, JAG1, DLL1, DLL4 a HES1 nebyl zjištěn významný rozdíl. U třech genů (NOTCH3, NOTCH4 a JAG2) byla nalezena významně vyšší hladina exprese v nádorové tkáni, zatímco exprese genů NOTCH2 a CNTN1 byla významně nižší v primární nádorové tkáni oproti kontrolní tkáni vaječníků. U všech genů zůstala navíc změna genové exprese významná i po provedení korekce dat dle Benjamini-Hochberga (Tab. 9 na str. 53).

Tab. 9 Změny genové exprese signální dráhy Notch a jejich cílových genů v primárních nádorech oproti kontrolní tkáni vaječníků

Gen	Účinnost qPCR reakce [%]	p – hodnota ^a	Změna exprese nádorová vs. kontrolní tkáň ^b
NOTCH1	104,81	0,077	-
NOTCH2	106,33	< 0,001	↓
NOTCH3	108,82	< 0,001	↑
NOTCH4	103,16	0,009	↑
JAG1	95,99	0,505	-
JAG2	94,70	< 0,001	↑
DLL1	95,32	0,920	-
DLL4	104,66	0,251	-
HES1	95,27	0,298	-
CNTN1	98,00	< 0,001	↓

Pozn.: Tučně vyznačené hodnoty byly významné i po provedení korekce dat dle Benjamini-Hochberga.

^aHodnota významnosti zjištěná pomocí Mann-Whitneyho testu v programu SPSS

^b↑ - zvýšená genová exprese, ↓ - snížená genová exprese

4.2.4 Souvislost genové exprese s klinicko-patologickými daty pacientek s nádory vaječníků

Na základě stanovených hladin exprese sledovaného setu genů byly následně hledány vztahy k prognostickým a prediktivním faktorům pacientek s nádory vaječníků. Jako prognostické charakteristiky sledovaného souboru pacientek byly hodnoceny FIGO stadium onemocnění (I nebo II vs. III nebo IV), grade onemocnění (1 nebo 2 vs. 3), histologický typ nádoru (HGSC vs. ostatní typy), patologický rozsah nádoru (pT), exprese proliferčního markeru Ki67 (%), výskyt progresu onemocnění a hodnocení léčebné odpovědi ve smyslu výskytu resistance vůči použité léčbě. Soubor pacientek byl pro tento typ analýz

rozdělen na dvě skupiny. První skupinu tvořily pacientky před léčbou, u kterých byly získány vzorky v rámci primárního chirurgického výkonu při odebrání nádorové tkáně před samotným použitím chemoterapie. Druhou skupinu pak tvořily pacientky, kde jsme měli k dispozici vzorky odebrané v rámci operace již po prodělané předoperační léčbě tzv. neoadjuvantní chemoterapii. Režimy použité v rámci neoadjuvantní léčby zahrnovaly kombinace paclitaxelu a derivátů platiny (karboplatina, cisplatina) a dalších látek, např. Avastinu. Ke statistickému vyhodnocení bylo využito programu SPSS. Nejprve byl proveden test Shapiro-Wilk normality rozložení dat. Na základě tohoto testu byly dále použity neparametrické testy – Kruskal-Wallise a Mann-Whitneyho pro faktoriální veličiny a Spearmanův a Pearsonův test pro kontinuální veličiny a pro zjištění směru významných vztahů byl využit ANOVA test.

V samotné expresi genů signální dráhy Notch ani cílových genů nebyl v nádorové tkáni vaječníků před léčbou a po léčbě významný rozdíl. Při porovnání hladin exprese sledovaného setu genů s klinicko-patologickými daty pacientek před léčbou a po léčbě byla ovšem nalezena řada významných vztahů. Nejprve byly hodnoceny vzorky pacientek před chemoterapeutickou léčbou. Všechny významné vztahy nalezené v této skupině jsou uvedeny v Tab. 10 na str. 55.

Tab. 10 Významné vztahy mezi genovou expresí signální dráhy Notch a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek s nádory vaječníků před léčbou

Charakteristika	Gen	p – hodnota ^a	Změna exprese ^b
Grade 3	NOTCH4	0,045	↓
	JAG1	0,010	↓
	HES1	0,032	↓
HGSC typ	NOTCH1	0,014	↑
	NOTCH4	0,016	↑
	JAG1	0,006	↑
	DLL1	0,035	↑
	DLL4	0,013	↑
	HES1	0,000	↑
	CNTN1	0,009	↑
Progrese	JAG2	0,025	↓

Pozn.: Tučně vyznačené hodnoty byly významné i po provedení korekce dat dle Benjamini-Hochberga.

^aHodnota významnosti zjištěná pomocí Mann-Whitneyho, Kruskal-Wallisova či Spearmanova testu v programu SPSS

^b↑ - vyšší genová exprese ↓ - nižší genová exprese

V této skupině pacientek byly nejvýznamnější vztahy, které zůstaly signifikantní i po provedení korekce dat dle Benjamini-Hochberga. Z genů receptorů Notch to byl vztah mezi vyšší hladinou exprese genu NOTCH4 a HGSC typem nádoru, který je agresivnější formou než ostatní histologické typy ovariálních nádorů. V HGSC byly nalezeny i vyšší hladiny genu NOTCH1, dále genů ligandů signální dráhy Notch JAG1 a DLL4 a také cílových genů HES1 a CNTN1. Zajímavá byla i souvislost nižší hladiny genu JAG2 s progresí

nádoru vaječníků i když tento vztah byl korekcí dle Benjamini-Hochberga vyhodnocen jako nesignifikantní.

Ve skupině pacientek po chemoterapeutické léčbě byly provedeny stejné analýzy jako v předchozí skupině. I zde byly nalezeny některé významné vztahy, i když hodnoty významnosti těchto vztahů jsou výrazně nižší než u pacientek před léčbou a rovněž nezůstaly významné po provedení korekce dat dle Benjamini-Hochberga (Tab. 10 a Tab. 11). Výsledky naznačují velký význam deregulace genové exprese na prognózu a predikci ovariálních nádorů a její ovlivnění v souvislosti s použitou chemoterapeutickou léčbou.

Tab. 11 Významné vztahy mezi genovou expresí signální dráhy Notch a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek s nádory vaječníků po neoadjuvantní léčbě

Charakteristika	Gen	p – hodnota ^a	Změna exprese ^b
Stadium III+IV	DLL1	0,012	↓
	DLL4	0,048	↓
pT 3 nebo 4	DLL1	0,045	↓
Progrese onemocnění	NOTCH3	0,042	↓

Pozn.: ^aHodnota významnosti zjištěná pomocí Mann-Whitneyho či Kruskal-Wallisova testu v programu SPSS

^b↑ - vyšší genová exprese, ↓ - nižší genová exprese

U kontinuálních veličin byla zjištěna významná korelace mezi věkem a geny NOTCH1, JAG1. Oba geny nabývají významně vyšších hladin exprese s přibývajícím věkem pacientek. Naopak nižší hladina exprese cílového genu signální dráhy Notch CNTN1 koreluje s vyššími hodnotami exprese proliferačního markeru Ki67, shrnuto v Tab. 12 na str. 57.

Tab. 12 Významné vztahy mezi genovou expresí signální dráhy Notch a kontinuálními klinicko-patologickými charakteristikami patientek s nádory vaječníků po neoadjuvantní léčbě

Gen	Charakteristika	p – hodnota ^a	Korelační koeficient <i>r</i> ; změna exprese ^b
NOTCH1	rostoucí věk	0,022	0,357 ↑
JAG1	rostoucí věk	0,033	0,333 ↑
CNTN1	vyšší exprese Ki67	0,028	-0,480 ↓

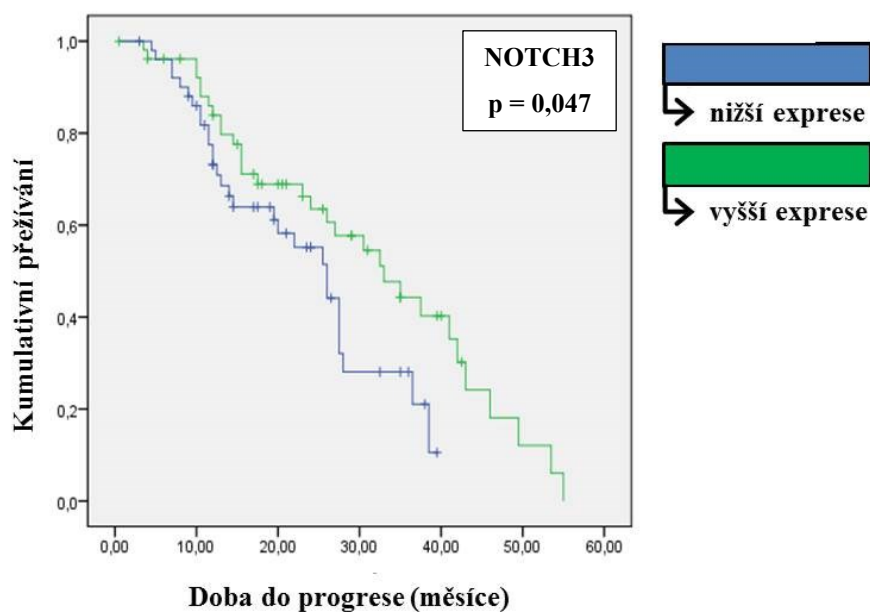
Pozn.: ^aHodnota významnosti zjištěná pomocí Pearsonova testu v programu SPSS

^b↑ - vyšší genová exprese, ↓ - nižší genová exprese

4.2.5 Korelace genové exprese s přežíváním patientek s nádory vaječníků

Na závěr byla provedena analýza vztahu hladin genové exprese signální dráhy Notch a jejích cílových genů k přežíváním patientek s ovariálním karcinomem.

U 129 patientek byla zaznamenána doba do progresu („time to progression“, označovaná jako TTP) v měsících. Průměrná hodnota doby do progresu byla 24 měsíců. Nejprve byly hodnoty exprese, které byly stanovovány v duplikátech, rozděleny dle mediánu na vzorky s vyšší a nižší expresí. Následně byl vztah s TTP hodnocen pomocí Kaplan-Meierova testu s testem významnosti Log rank. Významný výsledek byl nalezen pouze pro gen NOTCH3, u něhož byly nalezeny nízké hladiny exprese (pod medián) u patientek s významně kratší dobou přežívání do objevení prvních známek progresu nádoru vaječníků, jak je znázorněno na Obr. 17 na str. 58. Tento významný vztah byl prozkoumán i multiparametrickou regresí dle Coxe adjustovanou vzhledem ke stadiu, grade, histologickému typu nádoru a výskytu vzdálených metastáz. Výsledek po provedení multiparametrické analýzy nebyl signifikantní, takže jej bude nutné ověřit na nezávislém validačním souboru patientek.



Obr. 17 Významný vztah mezi hladinou genové exprese a TTP (dobou do progresu onemocnění) hodnocený Kaplan Meierovým testem v programu SPSS. Patientky byly rozděleny dle mediánu expresních hladin na subjekty s vyšší a nižší expresí. Na ose X je znázorněna doba do progresu (v měsících), na ose Y kumulativní přežívání souboru patientek.

5 Diskuze

Nádorová onemocnění patří k nejčastějším příčinám úmrtí v České republice. Mezi gynekologickými nádory pak nejvyšší mortalitu vykazují karcinomy ovarií. Tento fakt souvisí především s tím, že se u nádorů vaječníků nevyskytují brzké příznaky onemocnění a taktéž neexistuje žádný spolehlivý biomarker, který by pomohl onemocnění včas odhalit. Většinou je tak ovariální karcinom u pacientek diagnostikován až v pokročilém stádiu, kde je již prognóza onemocnění výrazně horší. Dalším významným faktorem ovlivňujícím úspěšnost léčby karcinomu ovarií je, v současné době, rozvoj tzv. mnohočetné lékové rezistence, což je proces, který souvisí s transportem cytostatik, jejich metabolismem či změnami v buněčném cyklu. Vznik rezistence vůči konvenčně používané chemoterapeutické léčbě, kterou tvoří v případě karcinomu ovarií především deriváty platiny a taxany, má za následek další rozvoj onemocnění a podílí se, do velké míry, na vysoké mortalitě ovariálního nádoru.

Vývoj a syntéza nových léčiv, které by byly účinné právě u rezistentních forem nádorů, jsou jednou z možností překonání mnohočetné lékové rezistence. Cílem práce bylo stanovit účinnost nových experimentálních derivátů konvenčních taxanů, které by se mohly stát potenciálními kandidáty pro léčbu rezistentního karcinomu ovarií či dalších solidních nádorů. Dalším cílem pak bylo stanovit prognostický a prediktivní význam genové exprese signální dráhy Notch u pacientek s ovariálním karcinomem. Tato dráha je deregulována působením taxanů a mohla by hrát úlohu v mechanismu působení taxanových léčiv a stát se potenciálním terapeutickým cílem léčby nádorů.

5.1 Část studie *in vitro*

V této části diplomové práce byl sledován vliv nových derivátů taxanů na nádorovou ovariální buněčnou linii NCI/ADR-RES rezistentní vůči konvenčním taxanům. [37] Jako nové experimentální taxanové deriváty byly použity dosud nestudované deriváty taxanů tzv. třetí generace (SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606), jejichž cytotoxicita v rezistentních buňkách karcinomu ovaria byla porovnávána s konvenčním taxanem paclitaxelem a zástupci taxanů II. generace (SB-T-1214 a SB-T-1216), od kterých jsou nové deriváty odvozeny. Cytotoxicita taxanů uvnitř buněk je zapříčiněna jejich vazbou na tubulin, která způsobí deformaci struktury mikrotu-

bulů a poruchu jejich funkce, což vede k ukončení mitosy a následně buněčné smrti. [39] Pro zjištění cytotoxicity a hodnoty IC_{50} nových derivátů taxanů bylo využito přístroje xCELLigence RTCA DP a rozsah koncentrací studovaných taxanů byl v rozmezí 10 – 30 000 nM. Účinnost paclitaxelu byla sledována v práci [37] a hodnoty IC_{50} byly stanoveny na 1000 nM a vyšší u buněčné linie NCI/ADR-RES. Hodnoty IC_{50} byly u taxanů druhé generace (SB-T-1214 a SB-T-1216) v NCI/ADR-RES buňkách až 30x nižší v porovnání s paclitaxelem. [48] Tato skutečnost je v dané práci vysvětlována tím, že taxany II. generace se lépe transportují do buněk a jejich zpětný tok je nižší. Tato skutečnost byla potvrzena i u dalších nádorových buněčných linií. [57, 97] V této diplomové práci bylo zjištěno, že v porovnání s paclitaxelem jsou nové deriváty III. generace až 50× účinnější. Tyto deriváty byly syntetizovány v roce 2016 a o jejich účincích a mechanismech působení není dosud mnoho známo. O to cennější jsou zjištěné poznatky. Nejnižší hodnoty IC_{50} byly stanoveny pro SB-T-121605 – 14,4 nM, SB-T-121402 – 17 nM a SB-T-121606 – 17,3 nM, což jsou v porovnání s paclitaxelem – 961 nM, hodnoty výrazně menší, další hodnoty IC_{50} sledovaných taxanových derivátů jsou uvedeny v Tab. 6 na str. 39. Působení chemoterapeutik v dané nádorové buněčné linii je závislé na čase, po který je mu tato linie vystavena. V našich experimentech jsme hodnoty IC_{50} získali přímo z vyhodnocení softwarem po 72 hodinovém působení taxanu. Toto časové rozpětí bylo vybráno na základě možného léčebného postupu. Časové rozpětí se s reálným průběhem může a nemusí shodovat. Nové taxanové deriváty mají různé funkční skupiny v postranních řetězcích, které pravděpodobně hrají roli v jejich celkové cytotoxicitě. Stony Brook Taxany („SB-T“), které jsou sledovány v této práci, jsou syntetizovány na základě dlouhodobých studií vztahů struktury a aktivity v laboratoři prof. Iwao Ojimy (University of New York at Stony Brook), se kterým naše laboratoř spolupracuje. Tyto funkční skupiny mohou ovlivňovat metabolismus taxanů, např. cytochromy P450 (participujících na metabolismu a detoxikaci xenobiotik) a vazebnou membránovými transportéry, které se podílejí na jejich transportu dovnitř a vně buňky. Taxany II. generace mají v postranním řetězci místo acetylu a fenylu jiné substituenty a v porovnání s paclitaxelem se ukázaly být významně účinné. [48, 57, 97, 98] Taxany III. generace byly syntetizovány s cílem ovlivnit jejich metabolismus cytochromy P450, a tím i jejich metabolickou inaktivaci zapříčiněnou působením těchto enzymů. Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že i jejich IC_{50} by měla být nižší oproti taxanům druhé generace, což také výsledky zjištěné v této práci ukázaly. Obecně platí pro všechna konvenční cytostatika, že cytotoxicita postihuje i zdravé buňky a proto, čím nižší je hodnota IC_{50} tím lépe.

Umožňuje to pak použít nižších koncentrací cytostatik pro dosažení stejného účinku, čímž lze snížit i nežádoucí účinky dané jejich systémovým použitím. V následující fázi této práce byly vybrány taxany III. generace s nejnižší hodnotou IC_{50} (SB-T-121402, SB-T-121605 a SB-T-121606) pro analýzu jejich vlivu na buněčný cyklus v rezistentních nádorových buňkách karcinomu ovaria. Rozsah koncentrací byl vždy okolo získané hodnoty IC_{50} . Pro sledování vlivu vybraných cytostatik byly buňky inkubovány s taxanem po dobu 24 hodin. Taxany působí na mikrotubuly a působí jako tzv. „mitotické jedy“, takže buněčný cyklus je pod jejich vlivem zastaven ve fázi G_2/M . [39, 41] V našich experimentech bylo porovnáváno působení výše zmíněných tří vybraných derivátů s taxany II. generace (SB-T-1214 a SB-T-1216). Bylo zjištěno, že rezistentní buňky karcinomu ovaria se působením nových taxanů v 20 nM koncentraci dostávají do fáze G_0 . Do této fáze se buňka dostane především, když nemá vhodné podmínky pro dělení, a to jak intracelulární tak extracelulární. Nárůst počtu buněk v této fázi je tedy signálem toho, že buňka rozpoznala, že se nenachází ve vhodném prostředí. Po inkubaci se 100 nM taxanem se výrazně vyrovnal poměr mezi G_0/G_1 -fází a G_2/M -fází, a to zhruba v poměru 1:1. V předchozích histogramech převažoval počet buněk v G_0/G_1 -fázi. Po inkubaci s 300 nM koncentrací taxanu jasně převažuje G_2/M -fáze, což je přesně fáze, ve které „mitotické jedy“ zasahují. Z histogramů ve výsledkové části práce je viditelné, že koncentrace 100 i 300 nM SB-T-derivátů je účinná a výrazně změni distribuci buněk v různých fázích buněčného cyklu. Počet buněk a rozdíly mezi nimi u jednotlivých cytostatik se mohou mírně lišit v důsledku „nasazování“ nebo „sklizení“ buněk, nicméně u všech sledovaných derivátů taxanů byly výsledky jejich působení na buněčný cyklus velmi podobné. Jako nejúčinnější se jeví SB-T-121605, který po inkubaci se 100 nM koncentrací vykazuje nejvyšší počet buněk v G_2/M -fázi, stejně tak i SB-T-121606. V literatuře byl sledován z hlediska vlivu na buněčný cyklus taxan SB-T-1216 v porovnání s paclitaxelem v buněčných liniích MDA-MB-435 a NCI/ADR-RES. [99] U taxanů III. generace jejich vliv na buněčný cyklus dosud sledován nebyl. V další fázi bude nutno zjistit jejich vliv přímo na buněčnou smrt. SB-T-121605 a SB-T-121606 byly na základě výsledků diplomové práce vybrány za vhodné kandidáty pro další fáze studie a sledování jejich účinků *in vivo* na rezistentní nádory ovaria v myších nádorových xenograftech v naší laboratoři.

5.2 Studie signální dráhy Notch u pacientek s nádory vaječníků

V předchozích studiích na Oddělení toxikogenomiky bylo zjištěno, že aplikace taxanů vede k významným změnám exprese genů signální dráhy Notch v ovariálních nádorových buňkách *in vitro*. Signální dráha Notch hraje důležitou roli v diferenciaci a zprostředkování buněčných odpovědí. Deregulace této dráhy může vést k rozvoji nádorových onemocnění. [71] Na základě těchto zjištění byly v rámci předkládané diplomové práce vybrány základní geny signální dráhy Notch (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 a DLL4) a dále cílových genů dráhy (HES1 a CNTN1) a byla studována jejich exprese u pacientek s nádorem vaječníků. Komplexně byly porovnávány hladiny transkriptů signální dráhy Notch v nádorové a kontrolní ovariální tkáni a následně byly hledány vztahy mezi hladinou exprese této dráhy, prognózou a účinností léčby ovariálního karcinomu. Potenciálně zajímavým genem je rovněž cílový gen signální dráhy HES1, jehož regulace působením genů signální dráhy Notch může ovlivňovat proces karcinogeneze, apoptózy a progresu nádoru. [79] HES1 je přímý cílový gen signální dráhy Notch a jejím prostřednictvím je aktivována jeho transkripce. CNTN1 podporuje aktivaci NOTCH1 a následnou translokaci intracelulární části do jádra. [100] V této práci byl zařazen jako další cílový gen signální dráhy Notch. Předpokladem celé této části studie bylo, že v nádorové tkáni dochází k deregulaci genové exprese signální dráhy Notch a jejich cílových genů a tyto změny mohou významně ovlivňovat prognózu onemocnění a účinnost léčby, zejména v případě, že jsou v terapeutických režimech používány taxany. Potenciální využití sledovaných genů jako biomarkerů v klinické praxi, které by přispělo k vývoji „skříninkových“ metod prognózy a progresu ovariálního karcinomu bylo dalším motivem studia této části diplomové práce. Do studie bylo zařazeno celkem 152 pacientek s ovariálním karcinomem, u kterých byla k dispozici kompletní klinicko-patologická data a rovněž terapeutický výstup a přežívání, které bývá u pacientek s ovariálním karcinomem obvykle posuzováno jako doba od ukončení léčby do poslední kontroly či nástupu progresu onemocnění nebo úmrtí. Sledovaný soubor pacientek, s takto detailní charakteristikou, patří svou velikostí v oblasti studií ovariálního karcinomu k robustním a poskytuje dostatečné informace pro statistické hodnocení dat a získání relevantních výstupů.

V této diplomové práci byla zjištěna významná „upregulace“ (zvýšená exprese) genů *NOTCH3*, *NOTCH4* a *JAG2* a „downregulace“ (snížená exprese) genů *NOTCH2*, a cílového genu *CNTN1* v nádorové ovariální tkáni ve srovnání s kontrolní tkání. V souladu

s našimi výsledky Jung a kol. [101] dříve zjistili signifikantní zvýšení exprese genu *NOTCH3* v nádorech pacientek s nádorem vaječníků. Exprese *JAG1* a *JAG2* byla také zvýšena, avšak změny nebyly signifikantní. Do této studie bylo zařazeno celkem 98 pacientek s epiteliálními nádory vaječníků. [101] Námi zjištěné změny expresních hladin signální dráhy Notch a významných cílových genů podporují tyto výstupy a ukazují význam sledované dráhy, přičemž její úloha u ovariálního karcinomu, zejména ke vztahu s prognózou a progresí onemocnění a změnami způsobenými chemoterapií, není dosud příliš objasněna.

Dále byly hledány vztahy mezi mírou exprese signální dráhy Notch a jejích cílových genů a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek s ovariálním karcinomem. Soubor pacientek byl rozdělen na dvě kategorie – před a po léčbě.

U pacientek před léčbou byla nalezena řada významných vztahů. Nejvyšší počet signifikantních změn byl zaznamenán ve vztahu k typu nádoru. S histologickým typem nádoru „high grade serous carcinoma“, který je agresivnější formou ovariálního karcinomu s horší prognózou, souvisela exprese největšího počtu genů, konkrétně vysoké hladiny exprese *NOTCH4*, *JAG1*, *DLL1*, *DLL4*, *HES1* a *CNTN1*, které zůstaly signifikantní i po korekci dat dle Benjamini-Hochberga. Z dalších klinických charakteristik byl ještě nalezen vztah exprese genu ligandu *JAG2* k progresi onemocnění, nižší exprese u progredujících pacientek.

V souboru pacientek po léčbě byla nalezena významná korelace pouze mezi stádiem a hladinou genu *DLL1*, konkrétně jeho nižší expresí u pacientek s pokročilým stádiem III nebo IV. Další významné geny se pohybovaly na hladině významnosti 0,05, a bude proto nutné je dále ověřit například na dalším, nezávislém, souboru pacientek. Absence významných vztahů mezi expresí signální dráhy Notch a jejích cílových genů s klinickými charakteristikami pacientek po léčbě ovariálního karcinomu nás vede k domněnce, že použití chemoterapeutické léčby významně ovlivňuje význam této dráhy pro prognózu onemocnění a působení cytostatik může významně ovlivnit funkci této dráhy. Dále byl nalezen vztah mezi výskytem progresu ovariálního nádoru a nižší expresí *NOTCH3* genu, pacientky s progresí měly významně nižší expresi *NOTCH3* v nádorové tkáni ve srovnání s pacientkami, u nichž k progresi během sledování nedošlo.

V poslední řadě byla sledována korelace genové exprese signální dráhy Notch s přežíváním pacientek s nádory vaječníků. Bylo zjištěno, že vyšší hladina exprese *NOTCH3* významně korelovala s delší dobou přežívání. Toto zjištění je v přímém rozporu

s tvrzením, které je uvedeno v nedávné studii, kde exprese NOTCH3 souvisela s horším přežíváním. [76] Souvislost mezi vyššími hladinami NOTCH3 a delším bezpříznakovým přežíváním pacientek s ovariálním karcinomem nalezená v naší studii Kaplan Maierovým korelačním testem však nebyla potvrzena Coxovou regresí, a proto je třeba tento případný vztah ověřit na dalším nezávislém souboru pacientek. V této studii nalezená deregulace NOTCH3 v nádorové tkáni pacientek, vztah exprese tohoto genu k progresi pacientek po léčbě a jejich přežívání představují NOTCH3 jako potenciální modulátor účinků taxanů a případně terapeutický cíl pro vývoj nových léčiv.

Na závěr lze konstatovat, že předkládaná práce splnila vytyčené cíle a potvrdila námi stanovené předpoklady. Byly vybrány nové deriváty taxanů s nejvyšší účinností v rezistentních nádorových buňkách ovaria (SB-T-121605 a 121606), které by se mohly zařadit do dalších studií směřujících k terapii rezistentních forem nádorů ovaria, např. modely *in vivo* a poté i klinické studie. Zjištěné nálezy je ovšem třeba ověřit na dalších studiích. Vyšší potenciální účinek na rezistentní buňky *in vitro* bude nutné ověřit s modely *in vivo* a dále prozkoumat metabolickou inaktivaci nových studovaných látek a rovněž jejich případnou toxicitu pro okolní tkáně a orgány, která by jejich klinické využití mohla komplikovat.

Ve druhé fázi studia byly nalezeny významné deregulace genů signální dráhy Notch a byl potvrzen její potenciální význam pro toto onemocnění, zejména vztah k agresivitě nádoru, progresi a přežívání pacientek. Deregulace dráhy Notch může představovat nejen nový mechanismus působení taxanů, ale rovněž potenciální terapeutický cíl, který by mohl posunout přístup k terapii ovariálního karcinomu směrem k individualizované léčbě.

6 Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem nových derivátů konvenčních taxanů na rezistentní nádorové buňky vaječníků NCI/ADR-RES a významem signální dráhy Notch u pacientek s nádory vaječníků. Práce je rozdělena na dvě části.

V první části studie jsou obsaženy experimenty *in vitro*, porovnávající účinnost nových taxanových derivátů (SB-T-121402, SB-T-121405, SB-T-121406, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) s paclitaxelem v nádorových buněčných liniích NCI/ADR-RES. V této části byla stanovena hodnota IC_{50} , tedy koncentrace způsobující 50% maximální inhibici. Bylo zjištěno, že hodnoty IC_{50} jsou po 72 hodinové inkubaci s vybranými taxanovými deriváty až 50× nižší v porovnání s paclitaxelem. Pro další studii byly vybrány nejúčinnější deriváty (SB-T-121402, SB-T-121605 a SB-T-121606) a byl sledován jejich vliv na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie. Nádorové buňky byly inkubovány s vybranými deriváty po dobu 24 hodin. Účinnější se jeví deriváty odvozené od SB-T-1216, konkrétně SB-T-121605 a SB-T-121606, ve kterých je patrné nejvýraznější zastoupení buněk v G_2/M -fázi, což je fáze, ve které taxany způsobují blok buněčného cyklu, a to již za použití 100 nM koncentrace, čemuž odpovídá i předchozí stanovení IC_{50} .

V druhé části studie byly stanoveny hladiny exprese hlavních zástupců signální dráhy Notch (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 a DLL4) **a jejich cílových genů** (HES1 a CNTN1) **a studován jejich význam u pacientek s nádory vaječníků**. Posuzovány byly nejen rozdíly v genové expresi mezi nádorovou a kontrolní tkání, ale také změny po chemoterapeutické léčbě a dále byly hodnoceny vztahy mezi hladinami genové exprese a klinicko-patologickými daty. V porovnání nádorové a kontrolní tkáně byly nalezeny významné změny u genů NOTCH3, NOTCH4 a JAG2, kde jejich exprese byla významně zvýšena. Oproti tomu exprese NOTCH2 a CNTN1 byla v nádorové tkáni významně snížena. U pacientek před léčbou byly nalezeny změny v expresi 7 genů (NOTCH1, NOTCH4, JAG1, DLL1, DLL4, HES1, CNTN1), jejichž zvýšená hladina souvisela s výskytem agresivní formy ovariálního nádoru tzv. „high grade serous carcinoma“ neboli HGSC. V souvislosti s přežíváním byl nalezen významný výsledek pro gen NOTCH3. Pacientky s nízkou hladinou exprese v nádoru přežívají bez progresu onemocnění významně kratší dobu než pacientky s vyšší hladinou exprese NOTCH3. Všechny tyto geny významně související s prognostickými a prediktivními faktory pacientek s ovariálním karcinomem jsou vhodnými kandidáty pro detailní studium jejich funkce

v ovariálních nádorových buňkách a potenciálního využití jako terapeutického cíle protinádorové terapie.

Z výsledků vyplývá, že nové deriváty taxanů jsou mnohonásobně účinnější v rezistentních nádorových buňkách než konvenční taxan paclitaxel a mohly by se stát potenciálními chemoterapeutiky pro terapii rezistentních nádorů. Signální dráha Notch se pak jeví jako možný prognostický biomarker a terapeutický cíl. Hlubší poznání této dráhy by mohlo zvýšit efektivitu léčby pacientek s ovariálními nádory a snížit tak hrozivě vysokou úmrtnost na toto nádorové onemocnění.

7 Seznam literatury

- [1] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2016): Stručný přehled mortalitních dat ČR z listu o prohlídce zemřelého 2004-2015, NZIS REPORT č. R/2 (09/2016), Praha
- [2] Stiborová M: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>
- [3] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2015): Novotvary 2015, Praha
- [4] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2016): Nová data Národního onkologického registru ČR (NOR) za rok 2014, NZIS REPORT č. R/1 (09/2016), Praha
- [5] http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, dostupné 28.4.2018
- [6] Klener P. (2002): Klinická onkologie, Galén a Karolinum, Praha
- [7] Stratil, P., Kubáň, V. (2004): Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách, Chemické listy 98, 379–87
- [8] Vokurka M. (2012): Patofyziologie pro nelékařské směry, Karolinum, Praha
- [9] Klener P. (1996): Protinádorová terapie, Galén, Praha
- [10] <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lecit/onkochirurgie/onkologicka-chirurgie>, dostupné 24.7.2018
- [11] Hou Y., Sun Z., Rao W., Liu J. (2018): Nanoparticle-mediated cryosurgery for tumor therapy, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 14 (2), 493-506
- [12] <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lecit/radioterapie-ozarovani/>, dostupné 25.2.2018
- [13] Klener P. (1996): Protinádorová chemoterapie, Galén, Praha
- [14] Perazella M. A. (2012): Onco-Nephrology: Renal Toxicities of chemotherapeutic agents, Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 7, 1713-1721
- [15] Florescu M., Cinteza M., Vinereanu D. (2013): Chemotherapy-induced cardiotoxicity, Maedica, 8(1), 59-67
- [16] Yang M., Moon C. (2013): Neurotoxicity of cancer chemotherapy, Neural regeneration research, 8(17), 1606-1614

- [17] Carelle N., Piotto E., Bellanger A., Germanaud J., Thuillier A., Khayat D. (2002): Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy, *Cancer*, 95(1), 155-163
- [18] Shi Y., He X., Yang S., Ai B., Zhang C., Huang D., Dong M., Liu P., Zhou S., Han X. (2007): Ramosetron versus Ondansetron in the prevention of chemotherapy-induced gastrointestinal side effects: a prospective randomized controlled study, 53, 44-50
- [19] Yoo H. J., Ahn S. H., Kim W. K., Han O. S. (2005): Efficacy of progressive muscle relaxation training and guided imagery in reducing chemotherapy side effects in patients with breast cancer and improving their quality of life, *Support Care Cancer*, 13, 826-833
- [20] Lukešová Š., Kopecký O. (2014): Praktické aspekty hormonální léčby karcinomu prsu, *Klinická farmakologie a farmacie*, 28 (3), 120-123
- [21] <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lecit/farmakoterapie/hormonalni-lecba-1/>, dostupné 25.2.2018
- [22] <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nova-leciva-v-terapii-ovarialniho-karcinomu-aneb-proc-zustava-zakladem-primarni-radikalni-operacni-vykon-481946>, dostupné 22.4.2018
- [23] Cortez A. J., Tudrej P., Kujawa K. A., Lisowska K. M. (2018): Advances in ovarian cancer therapy, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81, 17-38
- [24] Fong P. C., Yap T. A., Boss D. S., Carden C. P., Mergui-Roelvink M., Gourley Ch., De Greve J., Lubinski J., Shanley S., Messiou Ch., A'Hern R., Tutt A., Ashworth A., Stone J., Carmichael J., Schellens J. H. M., De Bono J. S., Kaye S. B. (2010): Poly(ADP)-Ribose Polymerase Inhibition: Frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval, *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), 2512-2519
- [25] Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D., Bray F. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International Journal of Cancer*, 136, 359-386
- [26] Holschneider Ch. H., Berek J. S. (2000): Ovarian cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic factors, *Seminars in Surgical Oncology*, 19, 3-10
- [27] Jayson G. C., Kohn E. C., Kitchener H. C., Ledermann J. A. (2014): Ovarian cancer, *Lancet*, 384, 1376-1388
- [28] <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>, dostupné 10.4.2018

- [29] Escudero J. M., Auge J. M., Filella X., Torne A., Pahisa J., Molina R. (2011): Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases, *Clinical Chemistry*, 57(11), 1534-1544
- [30] Heintz A. P. M., Odicino F., Maisonneuve P., Quinn M. A., Benedet J. L., Creasman W. T., Ngan H., Beller U. (2006): Carcinoma of the ovary, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 95, 161-192
- [31] Leong H. S., Galletta L., Etemadmoghadam D., George J., The Australian Ovarian Cancer Study, Kobel M., Ramus S. J., Bowtell D. (2015): Efficient molecular subtype classification of high-grade serous ovarian cancer, *Journal of Pathology*, 236, 272-277
- [32] American Joint Committee on Cancer (2002): AJCC Cancer Staging handbook
- [33] Mutch D. G., Prat J. (2014): 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer, *Gynecologic Oncology*, 133, 401-404
- [34] <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nova-leciva-v-terapii-ovarialniho-karcinomu-aneb-proc-zustava-zakladem-primarni-radikalni-operacni-vykon-481946>, dostupné 27.4.2018
- [35] Van Jaarsveld M. T. M., Helleman J., Berns E. M. J. J., Wiemer E. A.C. (2010): Micro RNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance, *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 42(8), 1282-1290
- [36] Capriotti K., Capriotti J. A., Lessin S., Wu S., Goldfarb S., Belum V. R., Lacoure M. E. (2015): The risk of nail changes with taxane chemotherapy: a systematic review of the literature and meta-analysis, *British Journal of Dermatology*, 173, 842-845
- [37] Ehrlichová M., Koc M., Truksa J., Nadova Z., Vaclavikova R., Kovar J. (2005): Cell Death Induced by taxanes in breast cancer cells: Cytochrome c is released in resistant but not in sensitive cells, *Anticancer Research*, 25, 4215-4224
- [38] Shou M., Martinet M., Korzekwa K.R., Krausz K. W., Gonzalez F. J. Gelboin H.V. (1998): Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver, *Pharmacogenetics*, 8(5), 391-401
- [39] Hennenfent K. L., Govindan R. (2006): Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?, *Annals of Oncology*, 17(5), 735-749
- [40] McGrogan B. T., Gilmartin B., Carney D. N., McCann A. (2008): Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1785, 96-132

- [41] Bořek-Dohalská L., Stiborová M. (2000): Taxany – protinádorová léčiva s unikátním mechanismem účinku, *Chemické listy*, 94, 226-229
- [42] Ojima I., Lichtenthal B., Lee S., Wang Ch., Wang X. (2016): Taxane anticancer agents: a patent perspective, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(1), 1-20
- [43] Vaclavikova R., Soucek P., Svobodova L., Anzenbacher P., Simek P., Guengerich P., Gut I. (2004): Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs, and minipigs, *Drug Metabolism and Disposition*, 32(6), 666-674
- [44] Marsh S., Somlo G., Li X., Frankel P., King C. R., Shannon W. D. McLeod H. L., Synold T. W. (2007): Pharmacogenetic analysis of paclitaxel transport and metabolism genes in breast cancer, *The Pharmacogenomics Journal*, 7, 362-365
- [45] Cresteil T., Monsarrat B., Dubois J., Sonnier M., Alvinerie P., Gueritte F. (2002): Regioselective metabolism of taxoids by human CYP 3A4 and CYP2C8: Structure-activity relationship, *Drug metabolism and disposition*, 30, 438-445
- [46] Monsarrat B., Royer I., Wright M., Cresteil T. (1997): Biotransformation of taxoids by human cytochromes P450: structure-activity relationship, *Bulletin du Cancer*, 84(2), 125-133
- [47] Sparreboom A., Van Tellingen O., Scherrenburg E., J., Boesen J. J., Huizing M., T., Nooijen W. J., Versluis C., Beijnen J. H. (1996): Isolation, purification and biological activity of major docetaxel metabolites from human feces, *Drug Metabolism and Disposition*, 24(6), 655-658
- [48] Ehrlichova M., Vaclavikova R., Ojima I., Pepe A., Kuznetsova L. V., Chen J., Truksa J., Kovar J., Gut I. (2005): Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel, and novel taxanes in human breast cancer cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 372(1), 95-105
- [49] Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K. (2000): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, *Klinická onkologie*, 13, 10-17
- [50] Klener P. jr, Klener P. (2013): Principy systémové protinádorové léčby, Grada Publishing
- [51] Tanwar J., Das S., Fatima Z., Hameed S. (2014): Multidrug resistance: An emerging crisis, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 1-8
- [52] Stavrovskaya A. A. (2000): Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells, *Biochemistry (Moscow)*, 65(1), 95-106

- [53] Hari M., Loganzo F., Annable T., Tan X., Musto S., Morilla D. B., Nettles J. H., Snyder J.P., Greenberger L. M. (2006): Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 270–278
- [54] Gut I., Ojima I., Vaclavikova R., Simek P., Horsky S., Linhart I., Soucek P., Kondrova E., Kuznetsova L. V., Chen J. (2006): Metabolism of new-generation taxanes in human, minipig and rat liver microsomes, *Xenobiotica*, 36(9), 772-792
- [55] Ojima I., Das M. (2009): Recent advances in the chemistry and biology of new generation taxoids, *Journal of Natural products*, 72(3), 554-565
- [56] Voborilová J., Nemcová-Furstová V., Neubauerová J., Ojima I., Zanardi I., Gut I., Kovar J. (2011): Cell death in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells, *Investigational New Drugs*, 29(3), 411-423
- [57] Otova B., Ojima I., Vaclavikova R., Hrdy J., Ehrlichova M., Soucek P., Voborilova J., Nemcová V., Zanardi I., Horský S., Kovar J., Gut I. (2012): Second generation taxanes effectively suppress subcutaneous rat lymphoma: role of disposition, transport, metabolism, in vitro potency and expression of angiogenesis genes, *Investigational New Drugs*, 30(3), 991-1002
- [58] Ojima I., Zuniga E., S., Berger W. T., Seitz J. D. (2012): Tumor-targeting drug delivery of new-generation taxoids, *Future Medicinal chemistry*, 4(1)
- [59] Ojima I., Lichtenthal B., Lee S., Wang Ch., Wang X. (2016): Taxane anticancer agents: a patent perspective, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(1), 1-20
- [60] Hager S., Ackermann C. J., Joerger M., Gillesen S., Omlin A. (2016): Anti-tumour activity of platinum compounds in advanced prostate cancer-a systematic literature review, *Annals of oncology*, 27(6), 975-984
- [61] Minckwitz von G., Kümmel S., Vogel P., Hanusch C., Eidtmann H., Hilfrich J., Gerber B., Huober J., Costa S. D., Jackisch Ch., Loibl S., Mehta K., Kaufmann M. (2008): Neoadjuvant Vinorelbine-Capecitabine versus Docetaxel-Doxorubicin-Cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: Phase III randomized GeparTrio Trial, *Journal of the National Cancer Institute*, 100(8), 542-551
- [62] Russo S., Ammori J., Eads J., Dorth J. (2016): The role of neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a review, *Future Oncology*, 12(5), 669-685

- [63] Matesanz R., Trigili C., Rodriguez-Salarichs J., Zanardi I., Pera B., Nogales A., Fang W. S., Jimenez-Barbero J., Canales A., Barasoain I., Ojima I., Diaz F. (2014): Taxanes with high potency inducing tubulin assembly overcome tumoural cell resistances, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 5078-5090
- [64] Ojima I., Chen J., Sun L., Borella Ch. P., Wang T., Miller M. L., Lin S., Geng X., Kuznetsova L., Qu Ch., Gallagher D., Zhao X., Zanardi I., Xia S., Horwitz S. B., Mallen-St. Clair J., Guerriero J. L., Bar-Sagi D., Veith J. M., Pera P., Bernacki R. J. (2008): Design, synthesis, and biological evaluation of new-generation taxoids, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(11), 3203-3221
- [65] Mohelnikova-Duchonova B., Kocik M., Brynychova V., Oliverius M., Hlavsa J., Honsova E., Mazanec J., Kala Z., Ojima I., Hughes D. J., Doherty J. E., Murray H. A., Crockard M. A., Lemstrova R., Soucek P. (2017): Hedgehog pathway overexpression in pancreatic cancer is abrogated by new generation taxoid SB-T-1216, *The Pharmacogenomics Journal*, 17, 452-460
- [66] Socinski M. A., Bondarenko I., Karaseva N. A., Makhson A. M., Vynnychenko I., Okamoto I., Hon J. K., Hirsh V., Bhar P., Zhang H., Iglesias J. L., Renschler M. F. (2012): Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial, *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), 2055-2062
- [67] Neesse A., Frese K. K., Chan D. S., Bapiro T. E., Howat W. J., Richards F. M., Ellenrieder V., Jodrell D. I., Tuveson D. A. (2014): SPARC independent drug delivery and anti-tumour effects of nab-paclitaxel in genetically engineered mice, *Gut*, 63, 974-983
- [68] Megerdichian Ch., Olimpiadi Y., Hurvitz S. A. (2014): nab-Paclitaxel in combination with biologically targeted agents for early and metastatic breast cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), 614-625
- [69] Ojima I., Das M. (2009): Recent advances in the chemistry and biology of new generation taxoids, *Journal of Natural Products*, 72(3), 554-565
- [70] Ehrlichova M., Ojima I., Chen J., Vaclavikova R., Nemcova-Furstova V., Voborilova J., Simek P., Horsky S., Soucek P., Kovar J., Brabec M., Gut I. (2012): Transport, metabolism, cytotoxicity and effects of novel taxanes on the cell cycle in MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(10), 1035-1048

- [71] Takebe N., Nguyen D., Yang S. X. (2014): Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges, *Pharmacology & Therapeutics*, 141, 140-149
- [72] Bray S. J. (2006): Notch signalling: a simple pathway becomes complex, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 678-689
- [73] Purow B. (2012): Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 727, 305-319
- [74] Mumm J. S., Kopan R. (2000): Notch signaling: From the outside in, *Development Biology*, 228, 151-165
- [75] Boggrefe, T., Oswald, F., (2009): The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes, *Cellular and molecular Life Sciences*, 66, 1631-1646
- [76] Brzozowa-Zásada M., Piecuch A., Michalski M., Segiet O., Kurek J., Harabin-Słowinska M., Wojnicz R. (2017): Notch and its oncogenic activity in human malignancies, *European Surgery*, 49(5), 199-209
- [77] Kopan R., Ilagan M. X. G. (2009): The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism, *Cell*, 137(2), 216-233
- [78] Bray S. J. (2016): Notch signalling in context, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 722-736
- [79] Liu Z. H., Dai X. M., Du B. (2015): Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance, *Cancer Biology & Therapy*, 16(3), 353-359
- [80] Chen J., Kesari S., Rooney C., Strack P. R., Chen J, Shen H., Wu L., Griffin J. D. (2010): Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres, *Genes Cancer*, 1(8), 822-835
- [81] Grudzien P., Lo S., Albain K. S., Robinson P., Rajan P., Strack P. R., Golde T. E., Miele L., Foreman K. E. (2010): Inhibition of Notch signaling reduces the stem-like population of breast cells and prevents mammosphere formation, *Anticancer Research*, 30(10), 3853-3867
- [82] Dailey D. D., Anfinsen K., P., Pfaff L. E., Ehrhart E. J., Brad Charles J., Bønsdorff T. B., Thamm D. H., Powers B. E., Jonasdottir T. J., Duval D. L. (2013): HES1, a target of Notch signaling , is elevated in canine osteosarcoma, but reduced in the most aggressive tumors, *BMC Veterinary Research*, 9: 130
- [83] Rose S. L. (2009): Notch signaling pathway in ovarian cancer, *International Journal of Gynecological Cancer*, 19, 564-566

- [84] Jung S. G., Kwon Y. D., Song J. A., Back M. J., Lee S. Y., Lee C., Hwang Y. Y., An H. J. (2010): Prognostic significance of Notch 3 gene expression in ovarian serous carcinoma, *Cancer Science*, 101(9), 1977-1983
- [85] Locatelli M. A., Aftimos P., Dees E. C., LoRusso P. M., Pegram M. D., Awada A., Huang B., Cesari R., Jiang Y., Shaik M. N., Kern K. A. Curigliano G. (2017): Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer, *Oncotarget*, 8(2), 2320-2328
- [86] Arai M. A., Akamine R., Tsuchiya A., Yoneyama T., Koyano T., Kowithayakorn T., Ishibashi M. (2018): The Notch inhibitor cowanin accelerates nicastrin degradation, *Scientific Reports*, 8: 5376
- [87] Yuyun X., Xi C., Qing Y., Lin X., Ke R., Bingwei S. (2018): Asiatic acid attenuates lipopolysaccharide-induced injury by suppressing activation of the Notch signaling pathway, *Oncotarget*, 9(19), 15036-15046
- [88] Liscovitch M., Ravid D. (2007): A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells, *Cancer letters*, 245(1-2), 350-352
- [89] <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/>, dostupné 19.7.2018
- [90] Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. (2017): Flow cytometry: basic principles and applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176
- [91] Analýza buněčného cyklu https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle_analysis, dostupné 28.3.2018
- [92] QIAGEN (2011): AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Handbook
- [93] Cerovská E. (2016): Biomarkery prognózy a účinnosti terapie ovariálního karcinomu, diplomová práce PřF UK
- [94] Elsnerova K., Mohelnikova-Duchonová B., Cerovská E., Ehrlichová M., Gut I., Rob L., Skapa P., Hruda M., Bartakova A., Bouda J., Vodicka P., Soucek P., Vaclavikova R. (2016): Gene expression of membrane transporters: Importance for progression of ovarian carcinoma, *Oncology reports* 35, 2159-2170
- [95] Soucek P., Anzenbacher P., Skoumalova I., Dvorak M. (2005): Expression of cytochrome P450 genes in CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells, *Stem Cells*, 23(9), 1417-1422

- [96] Hlavac V., Brynychova V., Vaclavikova R., Ehrlichova M., Vrana D., Pecha V., Kozvnikovova R., Trnková M., Gatek J., Kopperová D., Gut I., Soucek P. (2013): The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma, *Pharmacogenomics* 14, 515-529
- [97] Nemcova-Furstova V., Kopperova D., Balusikova K., Ehrlichova M., Brynychova V., Vaclavikova R., Daniel P., Soucek P., Kovar J. (2016): Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 310, 215-228
- [98] Botchkina G. I., Zuniga E. S., Das M., Wang Y., Zhu S., Savitt A.G., Rowehl R. A., Leyfman Y., Ju J., Shroyer K., Ojima I. (2010): New-generation taxoid SB-T-1214 inhibits stem cell-related gene expression in 3D cancer spheroids induced by purified colon tumor-initiating cells, *Molecular Cancer*, 9:192
- [99] Kovar J., Ehrlichova M., Smejkalova B., Zanardi I., Ojima I., Gut I. (2010): Comparison of cell death inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells, *Anticancer Research*, 29(8), 2951-2960
- [100] Wu H., Cao W., Ye D., Ren G., Wu Y., Guo, W. (2012): Contactin 1 (CNTN1) expression associates with regional lymph node metastasis and is a novel predictor of prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma, *Molecular Medicine Reports*, 6, 265-270
- [101] Jung S. G., Kwon Y. D., Song J. A., Back M. J., Lee S. Y., Lee C., Hwang Y. Y., An H. J. (2010): Prognostic significance of Notch 3 gene expression in ovarian serous carcinoma, *Cancer Science*, 101(9), 1977-1983
- [102] Ozols R. F., Bundy B. N., Greer B. E., Fowler J. M., Clarke-Pearson D., Burger R. A., Mannel R. S., DeGeest K., Hartenbach E. M., Baergen R. (2003): Phase III trial of Carboplatin and Paclitaxel compared with Cisplatin and Paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A gynecologic oncology group study, *Journal of Clinical Oncology*, 21(17), 3194-3200
- [103] Cannistra S. A., Matulonis U. A., Penson R. T., Hambleton J., Dupont J., Mackey H., Douglas J., Burger R. A., Armstrong D., Wenham R., McGuire W. (2007): Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 25(33), 5180-5186

Přílohy

Příloha I

Hodnoty Ct sledovaných i kontrolních genů ve vzorcích všech pacientek s nádorem vaječníku i vzorcích kontrolních (pacientky operované z jiného důvodu než maligní nádor, např. ovariální cysta):

SAMPLE NAME	UBC	PPIA	YWHAZ	ENDO mean	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4	JAG1	JAG2	DLL1	DLL4	HES1	CNTN1
PL11T	22,052	20,654	19,592	20,766	25,870	25,686	23,826	29,577	26,117	29,297	30,703	29,360	26,855	26,043
PL16T	22,061	20,250	20,179	20,830	24,834	24,389	22,932	27,763	23,264	28,161	26,983	26,904	24,956	25,962
PL17T	22,811	21,228	20,701	21,580	25,805	24,373	24,648	29,095	24,068	29,464	28,303	28,098	25,891	25,169
PL18T	21,940	20,948	20,674	21,187	25,119	24,788	23,829	27,560	23,844	29,152	28,668	26,814	27,314	26,000
PL19T	20,869	20,691	20,271	20,610	24,929	24,418	23,748	27,494	23,863	28,633	26,898	27,355	25,136	24,611
PL20T	21,448	20,543	20,248	20,747	24,837	25,550	24,247	29,441	22,716	29,248	26,723	29,029	24,810	27,132
PL23T	23,521	21,162	21,586	22,090	24,710	25,461	24,299	28,893	24,302	30,295	27,783	28,552	26,082	30,650
PL24T	21,730	20,251	19,801	20,594	24,770	25,267	24,127	30,167	24,466	28,086	27,667	29,407	27,416	28,454
PL25T	20,907	19,315	18,253	19,492	27,480	25,041	24,096	28,982	26,035	27,240	30,025	28,504	29,275	30,075
PL27T	22,285	21,387	19,515	21,062	25,900	25,983	24,901	30,112	25,211	27,915	29,995	29,556	27,375	30,179
PL29T	22,219	21,314	20,676	21,403	24,610	26,306	24,162	29,806	23,991	28,123	25,347	28,848	25,968	28,345
PL2T	20,921	19,485	19,005	19,804	23,921	24,946	24,227	28,327	24,179	26,602	28,780	27,675	27,258	30,733
PL30T	21,680	20,730	20,916	21,109	26,108	25,251	24,312	29,306	23,834	30,205	30,070	28,448	26,515	28,756
PL31T	22,295	20,960	20,125	21,127	25,825	25,299	24,056	29,402	23,943	29,435	30,184	28,901	25,702	26,563
PL32T	26,676	25,604	25,444	25,908	28,915	29,619	27,941	30,687	29,006	35,161	32,814	30,232	31,153	31,390
PL33T	22,528	21,115	21,069	21,571	25,134	25,493	23,949	28,035	24,826	28,109	28,792	27,817	27,651	28,354
PL34T	23,268	22,470	21,924	22,554	25,545	26,214	24,475	29,120	25,887	29,972	28,619	28,140	27,966	26,771
PL35T	21,606	21,904	22,478	21,996	25,432	25,414	24,642	28,468	24,622	29,569	27,620	28,618	28,363	28,213
PL37T	21,042	20,467	18,853	20,121	25,493	25,010	24,372	29,185	24,349	25,747	29,703	28,786	26,712	28,044
PL3T	21,487	20,357	20,228	20,690	26,142	24,183	24,620	30,262	24,720	28,140	29,467	30,154	28,488	25,897
PL41T	22,499	19,904	19,679	20,694	27,383	24,830	23,984	30,137	25,506	27,831	30,493	29,690	27,736	35,535
PL45T	22,223	20,859	20,386	21,156	24,562	25,987	24,375	28,366	24,294	28,666	29,002	28,116	26,678	31,928
PL47T	20,999	20,458	18,650	20,036	24,645	24,062	23,837	28,725	23,313	28,110	29,370	28,055	25,415	28,056
PL51T	22,350	21,335	23,000	22,228	25,252	25,564	24,929	28,788	24,443	29,298	27,737	29,011	26,148	30,292
PL52T	22,184	21,220	20,965	21,456	25,814	25,374	25,423	30,125	24,005	28,635	29,509	29,087	27,327	27,380
PL53T	21,673	20,392	19,107	20,391	24,684	23,724	21,361	27,944	23,662	27,318	26,496	27,071	26,285	27,972
PL55T	21,902	21,006	20,976	21,295	27,385	26,225	24,980	29,598	24,321	29,148	31,108	29,534	28,175	30,676
PL56T	22,396	22,348	21,796	22,180	27,669	25,469	27,917	31,216	25,553	32,800	28,069	31,232	27,834	25,456
PL57T	25,835	24,908	23,771	24,838	29,571	28,955	28,483	31,109	27,080	32,792	33,017	30,411	28,824	29,636
PL58T	25,118	24,664	24,528	24,770	27,899	28,089	25,273	31,665	26,015	31,725	30,665	31,196	29,881	30,921
PL59T	21,696	21,377	21,978	21,684	26,757	24,879	26,116	29,658	25,444	30,441	28,433	29,042	26,601	25,454
PL62T	21,674	20,128	19,910	20,571	25,475	24,486	23,718	29,104	24,516	27,436	29,623	28,701	28,404	29,573
PL64T	24,309	23,874	23,485	23,889	26,865	27,000	25,720	29,615	25,638	31,784	30,035	28,542	28,872	26,765
PL66T	21,747	21,385	20,412	21,181	26,566	24,661	26,002	29,957	24,602	30,970	25,935	29,785	24,010	25,057
PL69T	24,261	23,816	23,613	23,897	26,994	27,519	24,857	28,605	25,135	30,185	29,083	28,636	28,963	29,322
PL70T	21,817	21,347	20,537	21,234	26,410	24,475	24,637	30,877	24,942	29,625	29,839	27,411	26,301	27,499
PL72T	21,750	23,059	20,373	21,727	26,121	24,856	24,235	28,347	23,691	28,788	28,559	27,439	25,742	25,725
PL73T	22,339	21,807	21,083	21,743	26,910	24,979	25,925	29,470	24,442	30,875	27,672	28,832	24,866	25,511
PL74T	21,947	21,817	20,655	21,473	25,857	25,481	25,113	29,034	24,059	29,038	26,816	28,660	26,305	27,109
PL76T	21,142	20,665	19,394	20,400	24,104	24,003	22,512	28,319	23,961	26,960	26,791	27,258	25,011	26,572
PL79K	23,094	22,415	22,114	22,541	26,127	26,507	25,938	29,486	26,344	30,176	29,977	29,214	28,989	33,116
PL83T	23,471	21,807	22,916	22,731	26,410	27,926	26,940	31,018	26,905	30,852	29,852	29,893	26,605	31,404
PL84T	21,418	21,128	20,776	21,107	24,716	24,739	24,206	27,171	24,033	28,993	28,832	25,895	24,361	25,355
PL86T	22,626	20,277	20,895	21,266	26,461	24,838	23,832	29,999	25,586	29,385	29,526	28,836	27,374	29,029
PL87T	20,962	20,184	19,708	20,285	26,909	24,993	23,649	28,704	24,795	28,629	30,778	28,013	27,901	33,285
PL88T	21,495	20,265	19,579	20,446	26,315	24,545	24,709	29,798	25,509	29,002	28,803	28,754	25,853	28,803
PL89T	23,312	22,218	22,318	22,616	25,909	25,798	23,512	27,386	23,471	30,169	29,634	26,405	27,277	26,170
R100T	21,949	20,601	20,668	21,073	25,890	25,132	23,776	29,151	24,995	29,528	29,545	27,955	27,764	27,831
R101T	21,963	21,005	20,981	21,317	26,390	25,085	24,993	29,276	25,935	29,826	29,586	28,942	27,708	28,670
R102T	21,463	20,695	19,677	20,612	24,557	25,175	24,567	28,864	23,420	29,176	27,987	28,133	25,749	28,742
R103T	21,914	20,979	21,039	21,310	24,937	24,733	23,810	27,377	24,597	29,177	28,347	27,675	27,970	32,710
R105T	22,755	20,318	20,299	21,124	24,873	25,209	23,463	29,643	24,770	28,527	29,866	28,837	26,774	26,402
R107T	21,483	20,140	20,012	20,545	23,806	25,652	22,933	28,571	22,673	29,462	26,471	27,946	25,004	31,177
R109T	20,805	20,300	19,791	20,299	25,980	24,585	24,608	30,470	24,654	26,934	27,057	30,107	26,147	33,752
R110T	21,586	20,884	19,649	20,706	25,512	24,936	25,184	29,241	25,189	27,552	29,992	29,230	27,508	30,583

R111T	22,762	22,202	21,512	22,159	25,628	25,611	24,908	29,147	25,539	29,455	28,867	28,965	27,858	27,691
R112T	22,080	20,951	19,320	20,784	24,914	24,642	25,911	30,303	25,152	28,184	28,857	29,118	28,700	27,956
R114T	22,140	20,846	20,300	21,095	23,934	24,611	21,692	28,704	24,375	28,941	28,430	28,014	26,916	29,706
R115T	22,630	21,119	20,188	21,312	25,068	26,819	25,438	28,620	25,485	30,060	26,401	26,414	25,623	29,291
R116T	24,300	22,547	21,673	22,840	27,414	27,333	25,354	30,152	26,578	30,316	31,451	29,811	28,502	29,235
R117T	22,093	21,476	20,877	21,482	26,829	25,350	24,832	30,258	25,528	29,649	31,673	29,582	28,836	27,223
R118T	21,922	20,978	19,772	20,891	25,679	24,564	24,157	29,159	25,650	28,489	30,021	29,071	27,892	27,726
R119T	22,720	21,272	21,592	21,861	26,444	26,053	25,553	29,654	26,148	29,004	31,208	29,090	28,426	32,520
R11T	23,703	21,456	21,873	22,344	27,104	25,717	25,735	30,704	26,079	29,779	30,391	30,067	27,308	28,509
R121T	21,955	20,921	19,525	20,800	25,280	24,750	24,611	28,344	26,247	27,938	29,226	27,846	28,536	28,893
R122T	22,995	21,759	20,881	21,878	26,216	25,736	24,535	28,828	25,536	29,718	28,972	28,488	28,906	30,344
R123T	21,648	20,626	19,399	20,558	25,181	24,390	23,179	28,013	24,699	27,780	28,695	27,862	27,164	27,805
R125T	21,690	20,754	20,458	20,967	26,243	25,647	24,561	29,936	25,969	30,389	30,295	28,660	27,767	30,454
R127T	21,659	20,589	20,509	20,919	26,079	24,155	24,943	28,477	23,510	29,074	29,637	28,667	28,276	28,713
R128T	22,617	21,277	20,280	21,391	24,202	23,656	22,983	27,990	23,479	26,905	29,555	27,274	26,969	29,875
R12T	23,090	21,993	21,516	22,200	26,430	26,531	25,785	29,738	26,613	29,263	30,147	28,495	27,197	32,960
R131T	21,197	20,981	19,675	20,618	24,220	26,479	24,141	30,079	21,930	26,066	31,589	29,480	25,739	34,084
R133T	22,022	21,26	20,842	21,375	25,411	25,924	25,777	27,980	25,134	29,802	28,455	28,696	28,110	29,839
R136T	21,188	20,328	19,712	20,409	26,601	24,696	24,516	28,274	26,382	28,854	28,480	27,652	25,929	29,553
R137T	25,221	21,892	21,643	22,918	25,785	24,959	24,430	28,183	24,663	29,543	29,532	28,330	27,398	26,599
R138T	21,443	20,625	18,739	20,269	25,384	24,827	23,803	28,744	24,012	28,527	28,661	27,793	25,803	28,456
R139T	23,538	22,172	22,048	22,586	26,042	26,640	24,813	28,573	25,601	29,021	29,856	28,185	29,807	31,555
R141T	21,515	21,164	20,265	20,981	25,721	24,400	23,099	28,198	24,513	29,251	28,788	27,922	27,082	28,332
R143T	21,935	20,427	20,182	20,848	26,915	25,802	26,144	29,892	26,151	30,779	31,322	29,200	29,089	30,041
R144T	22,328	21,536	21,053	21,639	26,555	26,654	25,759	30,446	25,823	28,428	29,930	29,362	29,467	30,501
R145T	25,233	22,932	22,474	23,546	29,570	27,447	26,079	31,818	28,258	31,577	31,125	30,325	31,434	32,345
R146T	22,038	21,465	19,739	21,081	24,666	25,260	24,942	29,129	24,577	28,326	29,156	28,965	27,628	31,720
R148T	24,387	23,643	24,812	24,281	26,940	27,600	26,027	30,178	26,290	30,430	30,515	29,684	29,428	31,756
R149T	21,203	20,553	19,474	20,410	24,667	25,053	22,395	28,202	22,192	27,677	28,847	27,173	25,942	31,896
R150T	21,076	20,695	19,571	20,447	25,713	24,256	24,877	29,881	25,132	26,889	29,269	29,615	28,313	29,624
R151T	21,930	21,524	19,638	21,031	25,072	24,467	23,658	28,892	23,848	27,906	26,144	28,034	27,346	31,800
R152T	23,722	23,271	22,677	23,223	27,462	27,243	27,166	30,205	26,989	31,485	31,482	29,738	28,798	30,915
R153T	21,887	22,045	20,139	21,357	26,464	26,517	25,160	29,254	24,525	28,740	31,391	29,055	28,094	34,208
R154T	22,366	21,698	19,508	21,191	25,501	25,679	22,478	29,774	24,893	28,706	27,085	29,108	27,567	28,340
R155T	21,838	20,725	19,886	20,816	25,224	24,848	23,657	28,138	24,209	28,724	28,560	27,435	26,811	27,234
R156T	22,606	21,862	20,500	21,656	25,416	25,806	24,552	29,579	23,119	28,560	29,850	29,084	26,824	29,237
R157T	22,818	21,743	20,991	21,851	26,162	24,943	24,133	28,339	25,953	29,355	31,008	28,425	28,320	31,469
R158T	23,188	22,130	20,743	22,020	25,433	25,385	23,556	30,376	24,445	28,447	28,943	29,546	27,334	32,373
R159T	22,888	21,515	20,786	21,730	26,552	26,553	25,928	29,905	26,786	28,305	30,910	28,981	29,923	33,299
R15T	24,064	22,049	23,062	23,058	28,024	27,621	27,378	30,883	26,585	32,355	33,362	29,636	29,153	31,663
R160T	22,021	21,366	19,393	20,927	25,372	25,445	24,507	30,058	24,399	28,151	29,419	29,277	26,930	27,216
R162T	21,713	22,517	20,166	21,465	25,195	25,389	24,598	28,860	24,412	28,736	29,470	28,422	25,985	29,429
R163T	22,805	21,942	21,424	22,057	26,457	24,779	25,996	29,348	26,174	29,560	29,887	29,089	27,790	27,758
R164T	21,960	21,014	18,737	20,571	26,210	25,003	24,588	30,649	24,393	28,904	31,893	30,277	27,002	32,981
R165T	25,903	25,646	24,781	25,444	29,242	28,847	27,860	32,888	28,044	32,751	32,712	32,020	30,930	31,756
R167T	22,523	21,861	21,502	21,962	26,349	26,012	25,290	29,290	25,507	29,772	30,805	28,080	26,691	28,982
R168T	22,336	21,671	20,447	21,485	25,638	25,299	24,517	29,344	25,078	28,548	29,498	28,908	26,404	27,983
R16T	21,946	20,224	20,033	20,734	25,702	24,575	24,145	28,709	25,150	28,392	30,878	27,280	28,348	32,909
R17T	22,050	20,727	20,194	20,990	23,976	25,245	24,690	29,521	25,133	30,845	29,041	28,741	26,842	26,509
R20T	22,807	21,643	21,696	22,048	27,082	25,986	27,411	33,203	26,692	30,748	31,158	31,536	28,837	35,447
R21T	22,885	21,269	20,961	21,705	26,312	26,387	25,054	29,137	25,104	30,525	29,713	28,577	25,653	28,608
R22T	22,935	22,465	21,884	22,428	25,441	25,843	24,962	28,311	24,859	29,004	28,196	27,739	27,949	30,122
R23T	21,534	20,407	19,952	20,631	25,498	25,350	24,865	28,642	24,348	28,315	30,043	28,068	26,799	28,276
R24T	21,992	20,831	19,652	20,825	25,790	25,043	24,735	29,649	25,402	27,720	29,172	28,318	26,220	26,372
R25T	21,737	21,185	19,571	20,831	24,325	24,510	24,135	29,056	23,712	28,443	29,285	28,556	25,937	27,508
R27T	21,751	20,431	20,101	20,761	23,978	23,352	23,120	26,847	23,682	27,759	27,114	26,994	26,322	29,064
R28T	21,491	21,012	19,968	20,823	25,981	25,354	24,856	29,445	25,653	29,498	28,806	28,954	26,638	26,906
R32T	22,690	21,635	21,113	21,813	25,816	25,890	23,950	29,077	24,234	29,107	30,218	28,045	26,081	33,666
R33T	23,123	22,499	22,635	22,752	26,321	26,839	25,160	28,886	25,302	29,979	29,592	29,021	27,222	30,653
R34T	20,882	20,876	19,427	20,395	24,953	24,499	22,710	27,457	24,984	29,177	30,315	26,862	28,009	30,503
R35T	22,649	21,418	19,513	21,193	26,070	26,204	24,469	28,865	23,610	28,408	28,533	28,098	25,862	28,862
R38T	21,656	20,880	19,730	20,755	24,997	23,692	23,719	29,754	24,181	28,329	29,172	28,030	26,533	29,039
R41T	21,304	21,701	19,151	20,718	25,119	24,901	23,607	30,013	24,540	28,503	26,651	29,326	25,292	25,771
R42T	21,295	21,564	19,690	20,850	26,980	24,001	23,407	29,723	22,959	30,302	31,009	29,043	27,392	31,594
R43T	21,040	19,853	18,975	19,956	25,799	24,572	24,269	28,066	23,896	27,110	29,622	27,547	27,346	28,584
R44T	21,591	20,891	20,721	21,068	25,210	24,719	25,801	29,563	25,992	29,717	29,109	29,467	31,199	27,927
R45T	22,717	21,879	21,569	22,055	25,497	25,882	24,163	27,734	24,549	28,644	28,709	28,689	26,720	29,442
R47T	21,329	19,903	20,089	20,440	25,220	24,389	23,794	28,528	25,081	27,474	29,236	28,466	27,251	27,428
R4T	23,767	22,595	22,622	22,995	26,591	26,511	25,352	29,598	25,733	31,003	30,070	29,072	28,581	29,070
R50T	20,943	20,643	21,51	21,032	23,854	25,095	21,972	28,713	22,648	27,643	29,257	28,994	26,408	28,850

R53T	20,768	19,611	18,979	19,786	24,450	24,571	23,227	27,363	25,513	26,794	28,518	27,241	26,267	37,356
R54T	23,172	21,445	21,634	22,084	26,725	26,828	25,799	29,852	26,899	31,200	31,191	28,756	28,338	31,472
R55T	21,987	20,851	19,059	20,632	27,131	25,524	23,080	29,202	25,508	29,024	27,333	28,373	28,308	27,411
R56T	21,848	20,711	21,925	21,495	25,661	24,837	23,566	28,525	24,678	28,925	28,987	28,312	26,702	27,456
R58T	22,721	21,525	23,394	22,547	26,470	25,441	24,712	29,221	26,662	29,349	30,251	28,243	27,759	30,553
R59T	21,489	19,643	20,534	20,555	25,890	24,064	22,570	29,296	24,641	28,833	30,346	28,899	27,138	26,302
R5T	22,267	21,834	20,764	21,622	26,675	25,141	25,949	30,407	26,566	29,844	29,177	29,068	28,426	26,072
R61T	22,136	20,844	22,702	21,894	25,969	24,122	23,501	28,767	24,244	29,180	28,851	27,807	26,578	29,702
R62T	21,398	20,392	19,758	20,516	24,577	24,751	23,546	28,165	24,035	27,968	27,887	27,806	25,231	28,135
R65K	23,128	22,767	21,909	22,601	28,911	25,341	28,880	32,831	26,598	34,102	33,100	31,007	26,327	25,706
R66T	23,641	22,540	22,724	22,968	26,575	26,883	25,333	29,478	25,083	30,306	30,060	29,016	27,150	28,010
R67K	23,143	22,565	21,694	22,467	28,108	25,099	28,637	31,772	26,338	35,046	30,622	30,522	25,873	25,972
R68K	23,278	22,636	22,066	22,660	28,096	25,800	27,854	32,809	26,614	33,713	30,284	30,895	28,523	25,668
R69K	22,989	22,117	21,875	22,327	27,281	25,044	28,177	32,195	26,039	32,980	31,821	31,466	29,406	25,728
R6T	24,715	23,229	25,357	24,434	27,086	27,395	26,207	30,066	26,243	31,993	30,593	29,047	27,861	30,210
R70T	22,137	21,273	20,047	21,152	25,227	25,806	24,425	29,159	24,946	29,384	29,535	28,530	28,590	29,008
R71T	23,108	22,189	21,849	22,382	26,465	26,605	25,428	29,965	25,569	28,919	30,047	29,338	27,440	30,412
R72K	22,696	22,062	21,681	22,146	27,411	25,229	26,588	32,327	25,407	32,528	30,767	30,112	27,628	25,698
R73K	23,432	22,728	21,945	22,701	27,955	25,765	29,881	33,152	26,219	34,912	31,712	31,561	29,388	26,195
R74K	22,352	22,162	21,351	21,955	26,035	24,538	24,760	28,861	24,156	31,418	29,454	28,865	27,293	25,713
R76T	23,934	22,941	22,329	23,068	27,058	27,565	26,010	29,550	25,940	30,825	30,568	29,086	29,041	30,109
R77T	21,743	20,372	20,332	20,816	24,242	25,555	23,396	28,349	24,509	28,096	29,239	27,674	26,344	32,575
R78K	24,273	23,005	23,849	23,709	28,868	27,445	27,850	32,992	27,370	34,166	32,083	31,878	29,660	27,999
R79T	24,628	22,657	22,755	23,347	26,316	27,048	26,098	29,858	26,294	29,696	30,510	29,478	28,051	30,052
R7T	23,133	21,389	21,597	22,040	26,788	26,250	25,599	29,855	25,440	30,912	30,903	29,150	27,050	29,945
R80K	23,350	22,139	22,333	22,607	28,187	25,611	27,531	31,262	26,042	33,574	30,467	30,408	27,934	25,908
R81K	23,780	22,775	22,826	23,127	28,602	26,671	29,750	32,897	26,958	35,086	32,594	32,335	31,089	26,637
R83K	24,746	24,002	24,117	24,288	28,772	27,871	27,459	32,771	26,864	33,639	32,497	30,591	29,959	27,998
R84K	23,328	22,776	22,069	22,725	27,319	25,955	28,795	33,027	26,419	34,296	30,813	31,183	27,113	26,153
R85K	23,728	22,756	22,923	23,136	27,869	26,180	29,299	33,299	27,043	33,895	31,077	32,088	29,355	26,528
R88T	25,023	22,414	24,571	24,002	26,802	27,362	26,454	29,092	27,901	32,063	29,376	28,407	29,209	38,241
R89T	23,047	21,768	21,409	22,075	25,564	26,316	25,240	29,800	25,352	29,910	32,724	29,097	27,769	28,919
R90T	21,539	21,292	20,971	21,267	25,991	24,559	24,112	29,653	25,175	28,405	29,641	28,859	26,804	30,389
R92T	22,387	20,640	20,127	21,051	25,095	24,911	24,198	29,306	25,013	29,493	29,468	28,796	27,737	27,884
R93T	21,187	20,975	19,412	20,525	24,658	25,830	24,266	29,266	22,768	28,490	27,396	28,920	26,785	27,575
R94K	24,017	23,349	22,929	23,432	28,293	26,849	27,307	31,737	26,157	32,353	32,031	30,508	29,767	27,564
R95T	22,661	22,062	21,920	22,215	25,735	25,809	24,492	28,220	24,969	29,713	29,006	27,382	27,853	28,335
R96T	22,850	21,864	20,347	21,687	26,503	27,130	26,137	29,946	25,177	28,434	31,508	28,713	28,112	37,523
R97T	22,060	20,467	21,89	21,472	25,781	25,777	25,202	28,943	23,877	28,004	31,953	29,305	27,926	-
R98T	22,392	21,286	20,631	21,436	24,702	25,595	24,214	29,422	22,973	28,435	29,959	28,052	26,645	30,061
R99T	22,119	21,395	21,771	21,762	25,456	25,047	24,022	28,822	24,438	28,408	28,654	28,683	28,059	28,069
R9T	23,642	21,541	20,942	22,042	26,714	26,163	24,681	30,555	25,737	30,368	30,389	29,534	26,719	28,550

Příloha II

Prezentace dat diplomové práce na XVIII. setkání biochemiků a molekulárních biologů v Brně, 14.–15. 11. 2017

*Masarykova univerzita – Přírodovědecká fakulta,
Ústav biochemie a Národní centrum pro výzkum biomolekul
a
Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii*

pod záštitou

rektora Masarykovy univerzity doc. PhDr. Mikuláše Beka, Ph.D.
děkana Přírodovědecké fakulty MU doc. RNDr. Jaromíra Leichmanna, Dr.

XVIII. setkání biochemiků a molekulárních biologů

Sborník příspěvků



14. – 15. listopadu 2017

Konferenční centrum hotelu Continental v Brně

PŘEDEŠLÁ SETKÁNÍ BIOCHEMIKŮ A MOLEKULÁRNÍCH BIOLOGŮ V BRNĚ

14. července 1997; 21. ledna 1998; 3. února 1999; 9. února 2000;
14. února 2001; 7. února 2002; 29. ledna 2003, 3.–4. února 2004;
9.–10. února 2005; 8.–9. února 2006; 31. ledna–1. února 2007;
6.–7. února 2008; 14.–15. dubna 2009; 20.–21. dubna 2010; 1.–2.11.2011;
speciální sekce na XXIII. Biochemickém sjezdu 26. – 29. srpna 2012; 11.–12. listopadu 2014;
10.–11. listopadu 2015

<http://orion.chemi.muni.cz/Setkani/index.htm>

ÚČINNOST KLASICKÝCH A NOVÝCH TAXANŮ V BUŇKÁCH KARCINOMU VAJEČNÍKŮ

Kamila Koucká [1,2], Marie Ehrlichová [1,3], Veronika Brynychová [1,3], Iwao Ojima [4], Changwei Wang [4], Yan Su [4], Kateřina Elsnerová [1,3], Vessela N. Kristensen [5], Beatrice Mohelníková-Duchoňová [6], Pavel Souček [1,3], Radka Václavíková [1,3]

[1] Oddělení Toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika, [2] Přírodovědecká fakulta UK, Praha, Česká republika, [3] Laboratoř farmakogenomiky, Biomedicínské Centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Plzeň, Česká republika, [4] Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, USA, [5] Institute of Clinical Epidemiology and Molecular Biology (EpiGen), Akershus University Hospital, Oslo, Norsko, [6] Onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc

Taxany jsou významná chemoterapeutika využívaná při léčbě celé řady karcinomů, zejména pak u karcinomů prsu a vaječníků. Závažnou překážkou v úspěšnosti léčby je rozvoj tzv. mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance, MDR) nádorových buněk vůči použitým taxanům. Zmíněná rezistence je multifaktoriální proces související s transportem cytostatik, jejich metabolismem či změnami mitotického aparátu a apoptosy. Nové syntetické deriváty taxanů (SB-T taxany) mohou být vhodnou alternativou pro léčbu rezistentních karcinomů, kde se předpokládá jejich vyšší účinnost. Cílem této práce je vysledovat a porovnat účinnost klasických a nových taxanů na nádorových ovariálních buněčných liniích, jejich účinek v rámci apoptosy a mechanismus molekulárních změn vyvolaných po jejich působení.

Jako experimentální model jsme použili dvě buněčné linie; OVCAR-3, která je senzitivní na léčbu paclitaxelem, a NCI/ADR-RES linií, která je vůči paclitaxelu rezistentní. Účinek nově syntetizovaných derivátů taxanů na tyto buněčné linie byl v porovnání s paclitaxelem významně vyšší (v průměru 100×). U neúčinnějších derivátů byl změněn jejich vliv na buněčný cyklus a indukci apoptosy. Byly vybrány neúčinnější deriváty nových taxanů, které se jeví být vhodnými kandidáty pro léčbu rezistentních karcinomů ovaria.

Dále byly pomocí mikročipů změřeny změny, které paclitaxel a nový taxan (SB-T-1216) vyvolávají na úrovni mRNA a miRNA v rezistentních buňkách (NCI/ADR-RES). Byly nalezeny významné rozdíly v expresi mRNA a miRNA způsobené působením taxanů a identifikovány tak významně deregulované geny a dráhy působením taxanů (např. SLC transportéry, NOTCH a AhR signální dráhy). Tyto dráhy jsou v současné době sledovány jako cíle potenciálního terapeutického zásahu při léčbě ovariálního karcinomu.

Tato studie je podporována granty GAČR P303/12/G163, AZV č. 15-25618A a Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.



EFFICIENCY AND TRANSPORT OF CLASSICAL AND NOVEL TAXANES IN OVARIAN CANCER CELLS



K. Koucká^{1,2}, M. Ehrlichová^{1,3}, V. Brynychová^{1,3}, I. Ojima⁴, C. Wang⁴, Y. Su⁴, K. Elsnerová^{1,3}, V. N. Kristensen⁵, B. Mohelníková-Duchoňová⁶, P. Souček^{1,3} a R. Václavíková^{1,3}

¹Laboratories of Toxicogenomics, National Institute of Public Health in Prague, CZ; ²Faculty of Science, Charles University, CZ; ³Laboratory of Pharmacogenomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, CZ; ⁴Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, USA; ⁵Institute of Clinical Epidemiology and Molecular Biology (EpiGen), Akershus University Hospital, Norway; ⁶Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, CZ; E-mail: kouckak@natur.cuni.cz

INTRODUCTION

Taxanes are widely and successfully used anticancer drugs, especially ovarian and breast carcinomas. One of the main problem in therapy is **multidrug resistance** of tumor cells to classical taxanes – paclitaxel, docetaxel. This resistance is a multifactorial process which can be related to drug transport, metabolism or alterations in apoptosis induction by taxanes.

New synthesized taxanes – SB-T taxanes of second and third generation report high potency **against drug resistance** of cancer cells.

AIMS of our study were to explore and compare the efficiency and molecular mechanism of action of classical and novel taxanes in our experimental model of ovarian carcinoma cells.

Tab. 1: Structure of taxanes and their side chains.

TAXANE	SUBSTITUENT				
	R ¹	R ²	R ³	X	Y
Classical taxanes					
Paclitaxel	Ac	Ph	PhCO	H	H
Docetaxel	H	Ph	t-Boc	H	H
Second generation taxanes					
SB-T-1214	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	H	H
SB-T-1216	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	H	H
Third generation taxanes					
SB-T-121402	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	Me	H
SB-T-121602	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	Me	H
SB-T-121405	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121605	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121406	c-PrCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₂ H	H
SB-T-121606	Me ₂ NCO	i-butenyl	t-Boc	OCF ₂ H	H

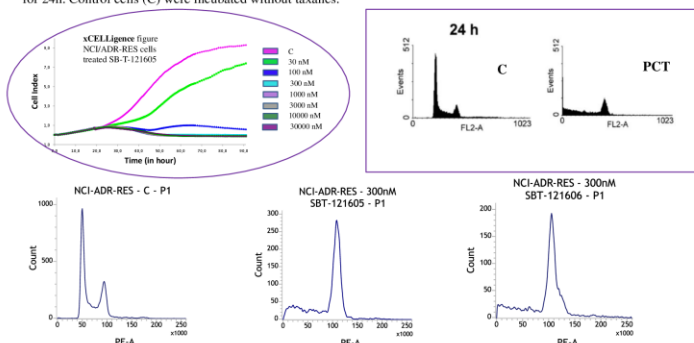
RESULTS

Tab. 2: The effect of second generation taxanes and third generation taxanes on the growth and survival of NCI/ADR-RES cells was higher as compared to that of paclitaxel. Novel taxoids demonstrated higher sensitivity (10-1000-fold) to paclitaxel.

Taxanes and resistant cell line NCI/ADR-RES								
IC ₅₀ /[nM]	Paclitaxel	SB-T-1214	SB-T-121402	SB-T-121405	SB-T-121406	SB-T-1216	SB-T-121602	SB-T-121605
	4000	5	17	191	43	3	38	15
								17

Cell cycle analysis by flow cytometric with PI staining.

NCI/ADR-RES cells were treated with 3000 nM Paclitaxel or 300 nM SB-T-121605 or SB-T-121606 concentrations for 24h. Control cells (C) were incubated without taxanes.



MATERIAL AND METHODS

CELL GROWTH AND SURVIVAL

-> 10⁵ cells/100 µl of medium -> plastic plate
-> cell growth and survival - after 72h of incubation by xCELLigence Real-Time cell Analyzer

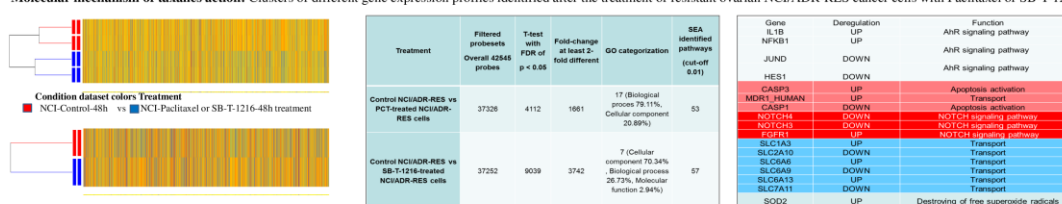
PROPIDIUM IODIDE STAINING ANALYSIS

-> 5x10⁵/2.5 ml of medium per well of a 6-well plate
-> after 24 h incubation -> cells were harvested and fixed in ethanol
-> fixed cells were washed with PBS, incubated with PI solutions, stained and analyzed by FACSVerse (Becton Dickinson)

MOLECULAR MECHANISM OF TAXANES

-> changes of gene expression profiles were measured after the treatment of resistant ovarian NCI/ADR-RES cancer cells with Paclitaxel or SB-T-1216 using Affymetrix U133 Gene Chip Microarrays in biological doubles
-> data were analyzed using Genespring software (Agilent Technologies v13.1)

Molecular mechanism of taxanes action: Clusters of different gene expression profiles identified after the treatment of resistant ovarian NCI/ADR-RES cancer cells with Paclitaxel or SB-T-1216



CONCLUSIONS

Novel taxoids are:

- more efficient against resistant cancer cells than classical taxanes
- potential candidates for treatment of classical taxane-resistant tumors especially: SB-T-121402, SB-T-121605, SB-T-121606

Changes in gene expression revealed particular genes and pathways as novel potential targets of therapy.

ACKNOWLEDGEMENT

This study is supported by GACR (grant P303/12/G163), AZV no. 15-25618A and National program of sustainability I (NPU I) no. LO1503 Ministry of education, youth and sports.

Příloha III

Přednáška prezentující data z diplomové práce na vědeckém setkání, 25.–27. 5. 2018 Javorná

Název prezentace: Molekulární změny a význam NOTCH signální dráhy u pacientek s ovariálním karcinomem

Přínos farmakogenomiky v diagnostice a léčbě generalizovaného kolorektálního karcinomu IX.

Javorná 25.-27.5.2018

**Pracovní setkání řešitelů projektu UNCE/MED/006: Centrum klinické a experimentální
jaterní chirurgie**

Odborný program:

PÁTEK 25.5.2018

Večere

18:00-19:30

Zahájení odborného programu

Pátek 25.5.2018

19,30-19,45

Uvítání účastníků – přednesení možnosti sobotního výletu či jiného vyžití. 15 min

Blok 1

Pátek 25.5.2018

19,45-21,00

1, Fiala O., Šorejs O., Liška V., Topolčan O., Fínek J.: Možnosti využití sérových onkomarkerů k odhadu prognózy a predikci efektu cílené léčby pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. 15min

2, Šorejs O.: Adjuvantní onkologická léčba kolorektálního karcinomu. 15 min

3, Vyčítal O., Pitule P., Hošek P., Kříž T., Liška V.: Genová exprese *serpinu* B9 u pacientů s kolorektálním karcinomem. 15 min

4, Ostašov P., Pálek R., Královcová E., Vyčítal O., Pitule P.: Volná cirkulující mRNA v krvi a její změny u pacientů s kolorektálním karcinomem. 15 min

Odborná diskuze

15 min

Blok 2

Pátek 25.5.2018

21,15-22,10

5, Brůha J., Dubová M., Křížková V., Liška V., Hošek P., Skalický T., Fichtl J., Mírka H., Bajcarová K., Duras P., Lysák D., Třeška V.: Význam tumor infiltrujících lymfocytů jako prognostických faktorů u pacientů po embolizaci portální žíly (PVE) a po PVE s aplikací autologních kmenových buněk 15 min

6, R. Pálek, J. Rosendorf, C. Schindler, L. Bednář, T. Kříž, M. Dolanský, V. Tégl, O. Brzoň, Liška V., Třeška V., Dahmen U.: Decelularizace jater jako první krok v přípravě umělého orgánu 15 min

7, Rosendorf J., Červenková L., Pálek R., Tégl V., Brzoň O., Bednář L., Kříž T., Dolanský M., Liška V., Třeška V., Tonar Z., Malečková A., Lukáš D., Horáková J.: Fortifikace anastomóz na zažívacím traktu nanomateriály 15 min

Odborná diskuze

10 min

Společenský večer

Pátek 25.5.2018

22,10-24,00

SOBOTA 26.5.2018

Blok 3

Sobota 26.5.2018

17,00-18,10

- 8, Vodička P.: Chromosomal damage, relative telomere length and DNA repair in colorectal and breast carcinogenesis. 15 min
- 9, Urbanová M.: Když selže opravář – aneb současné poznatky o MSI. 15 min
- 10, Kroupa M.: Relationship of relative telomere length in tumor tissue and adjacent mucosa of colorectal cancer patients with molecular features, cancer progression and patient's prognosis. 15 min
- 11, Hošek P.: Vztah mezi intervaly spolehlivosti a p-hodnotou. 15 min
- Odborná diskuse 10 min

Večeře

18,10-19,10

Blok 4

Sobota 26.5.2018

19,10-20,20

- 12, Holý P., Kloudová A., Souček P.: Polymorfismy v genech oxysterolové dráhy ve vztahu k nádorovým onemocněním. 15 min
- 13, Souček P., Kloudová A., Wei S., Koževnikovová R., Guengerich F. P.: Cirkulující oxysteroly u pacientek s karcinomem prsu. 15 min
- 14, Brynychová V.: MiRNA jako prognostické a prediktivní markery u karcinomu prsu. 15 min
- 15, Hlaváč V., Ehrlichová M., Elšnerová K., Koževnikovová R., Vrána D., Gatěk J., Souček P.: Role genetické variability membránových transportérů u karcinomu prsu. 15 min
- Odborná diskuse 10 min

Blok 5

Sobota 26.5.2018

20,30-21,50

- 16, Dvořák P., Hlaváč V., Mohelníková-Duchoňová B., Liška V., Souček P.: Expresní profily ABC genů z nenádorové tkáně představují možné nové prognostické markery u nádorů kolorekta a pankreatu. 15 min
- 17, Ehrlichová M.: Buněčná smrt u pankreatických nádorových linií. 15 min
- 18, Koucká K., Ehrlichová M., Brynychová V., Rob L., Hruša M., Bouda J., Bartáková A., Šeborová K., Fiala O., Souček P., Václavíková R.: Molekulární změny a význam NOTCH signální dráhy u pacientek s ovariálním karcinomem. 15 min
- 19, Pitule P., Kolíková P., Hošek P., Kríž T., Nayyabi N., Ostašov O.: MBNL regulátory alternativního sestřihu u kolorektálního karcinomu 15 min
- Odborná diskuse 10 min


Zasedání koordinačních pracovních skupin projektu UNCE/MED006: Centrum klinické a experimentální interní chirurgie – vyhodnocení dosavadního průběhu, plán činnosti na 2. pololetí 2018.

22,00-22,30

Příloha IV

Přednáška prezentující data z diplomové práce na Seminári a setkání studentů Univerzity Karlovy a University of Oslo, 6.–9. 6. 2018 Oslo

Název prezentace: NOTCH signalling pathway and its role and importance in patients with ovarian carcinoma

UIO  **University of Oslo**
Institute of Clinical Medicine

Date: 12 June 2018

Dear Sirs,

It was my pleasure to host Assoc. Prof. Pavel Soucek and his group and arrange a seminar for his and our PhD and MSc students at our Institute for Cancer Research, and University of Oslo (uio) on Translational Cancer Medicine in the period from 6th to 9th June 2018.

Thereby, I would like to certify that the following students from Pavel Soucek's group have been hosted at Oslo University and had talks with titles:

Maria Kovacova: Decision tree for prioritizing variants in oncogenes and pharmacogenes using combination of web-based and command-line tools in exome sequencing studies

Petr Holy: Variability in oxysterol-related genes in cancer

Karolina Seborova: Long Non-Coding RNA: significance in ovarian cancer

Kamila Koucka: NOTCH signalling pathway and its role and importance in patients with ovarian carcinoma

Katarina Buranovska: Analysis of circulating markers in patients with solid tumors

We all really enjoyed this seminar and stay of Czech colleagues here.

Many thanks for assisting in the organisation of this remarkable event,

Best wishes,



Vessela Kristensen
professor, PhD

Department for Clinical Molecular Biology (EpiGen), Faculty of Medicine, University of Oslo;
and Group of Cancer Genome Variation, Department of Genetics, Institute for Cancer Research, Oslo University
Hospital-Radiumhospitalet, Oslo, Norway

*All Nature is but Art, unknown to thee;
All chance, direction which thou canst not see;
All discord, harmony not understood.*
Alexander Pope

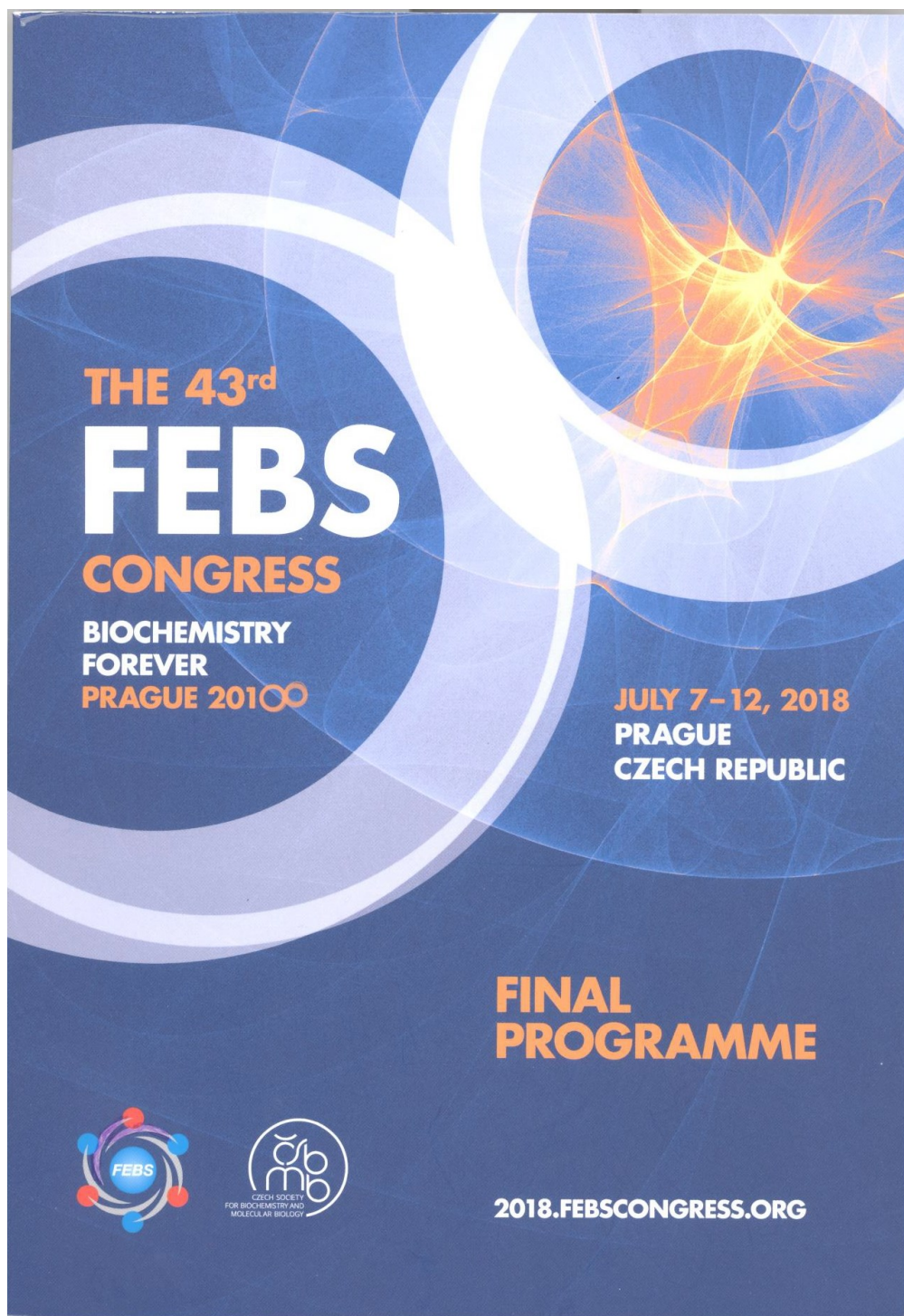


E-mail: vessela.kristensen@medisin.uio.no
<http://radium.no/kristensen/>
<http://www.med.uio.no/klinmed/personer/vit/vessela/>

Příloha V

Přednáška prezentující data z diplomové práce na kongresu FEBS, 7.–12. 7. 2018 Praha

Název prezentace: Molecular mechanism of action of classical and next-generation taxanes for their potential effects in resistant ovarian tumors



BIOCHEMISTRY FOREVER PRAGUE 2010

List of Posters

P.10-065-Tue

The link between mechanosensitive potassium channel and epithelial-mesenchymal transition in cancer cells • Yangmi Kim (South Korea)

P.10-066-Wed

An adhesion molecule, ARHGEF7, regulates the cell cycle progression in colon cancer • Eun-Young Shin (South Korea)

P.10-067-Mon

Role of PDLIM4 in triple-negative breast cancer • Anna Ivanova (Russia)

P.10-068-Tue

NNMT knockdown enhances autophagy for resistance to nutrient starvation in liver cancer • Sun Mi Hong (South Korea)

P.10-069-Wed

New Synergic Biomaterials for Anti-Cancer Therapy • Bresler Swanepoel (South Africa)

P.10-070-Mon

Role of SCF(FBXW7) on cell proliferation recovery after UV treatment • Maria Galindo Moreno (Spain)

P.10-071-Tue

Molecular mechanism of action of classical and next-generation taxanes for their potential effects in resistant ovarian tumors • Radka Vaclavikova (Czech Republic)

P.10-072-Wed

The Biological Role of LYVE-1 in Lung Cancer • Murat Serilmez (Turkey)

P.10-073-Mon

Targeting NHL B-cell Receptors for Personalized CART Therapy • Roman Kalinin (Russia)

P.10-074-Tue

Can DCLK1 be a biomarker for head and neck cancer? • Ceren Tilgen Yasasever (Turkey)

P.10-075-Wed

Novel minor isoform of securin lacks D-box and exhibits distinct expression pattern and transcriptional activity • Denis Demin (Russia)

P.10-076-Mon

Effect of acorus calamus and apium graveolens extracts on Egfr and Erbb2 in LNCaP cells • Halit Buğra Koca (Turkey)

P.10-077-Tue

Apium graveolens extract induces apoptosis via Bax and p-53 proteins in the LNCaP human prostate cancer cell line • Tülay Köken (Turkey)

P.10-078-Wed

Characterization of the ubiquitin ligase for S6K2 may overcome apoptotic barrier for breast and lung cancer cells • Nurettin Sever (Turkey)

P.10-079-Mon

Specific effectors of topoisomerase II poisons contribute to cytotoxicity in AML cell lines • Piyush More (Germany)

Molecular mechanism of action of classical and next-generation taxanes for their potential effects in resistant ovarian tumors

R. Vaclavikova^{1,2}, K. Koucka¹, M. Ehrlichova M^{1,2}, V. Brynychova, B^{1,2}. Mohelnikova-Duchonova³, I. Ojima⁴, V.N. Kristensen⁵ and P. Soucek^{1,2}

¹Laboratories of Toxicogenomics, National Institute of Public Health in Prague, Czech Republic; ²Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic; ³Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic; ⁴Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, USA; ⁵Institute of Clinical Epidemiology and Molecular Biology (EpiGen), Akershus University Hospital, Oslo, Norway

Taxanes are widely used anticancer drugs. However, drug resistance of tumor cells to classical taxanes presents one of the major obstacles in successful therapy. At present, new anticancer drugs on the basis of taxanes are developed as potential drugs effective in resistant type of tumors. We explored efficacy of classical (paclitaxel) and next-generation Stony Brook taxanes (SB-taxanes) *in vitro* in sensitive and resistant models of cancer cells. Twelve examined SB-taxanes (SB-T-1214 and SB-T-1216 derivatives and fluoro-derivatives) demonstrated significantly higher cytotoxicity and accumulation than paclitaxel in resistant tumor cells. SB-T-1214, SB-T-1216 and SB-T-12854 were also efficient *in vivo* in rat lymphomas and mouse xenograft models of pancreatic carcinoma. Accordingly, SB-taxanes seem to be potential candidates for treatment of classical taxane-resistant tumors. In the frame of molecular mechanism of action, we have measured mRNA and miRNA profile changes using Affymetrix arrays in resistant ovarian carcinoma cells (NCI/ADR-RES) after the treatment with paclitaxel and compared data with one of the most efficient taxanes, SB-T-1216. We have found significant differences in mRNA and miRNA profiles linked to the action of taxanes and identified key pathways and genes for molecular mechanism of taxane action (e.g., SLC transporters, NOTCH and AhR signaling pathways, Hedgehog pathway). Subsequently, NOTCH signaling pathway genes were selected for estimation of their genetic profile in ovarian carcinoma patients. High inter-individual variability of gene expression from NOTCH pathway was found and particular associations of expression with prognosis of ovarian carcinoma were also identified. NOTCH signaling pathway was suggested as potential therapeutic target in ovarian carcinoma therapy suitable for further research.

Supported by the research grants CSF no. P303/12/G163, AZV no. 15-25618A and NIH/CA103314.

MOLECULAR MECHANISM OF ACTION OF CLASSICAL AND NEXT-GENERATION TAXANES FOR THEIR POTENTIAL EFFECTS IN RESISTANT OVARIAN TUMORS

R. Vaclavikova^{1,2}, K. Koucka¹, M. Ehrlichova^{1,2}, V. Brynychova^{1,2}, B. Mohelnikova-Duchonova³, I. Ojima⁴, VN Kristensen⁵ and P. Soucek^{1,2}

¹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, ²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, ³Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic, ⁴Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, USA, ⁵EpiGen Institute, Akershus University Hospital, Oslo, Norway **E-mail: radka.vaclavikova@szu.cz**

BACKGROUND AND AIMS

Taxanes are widely used anticancer drugs. However, drug resistance of tumor cells to classical taxanes presents one of the major obstacles in successful therapy. At present, new anticancer drugs on the basis of classical taxanes (paclitaxel, docetaxel) are developed as potential drugs effective in resistant types of tumors.

AIMS OF THE STUDY:

- Comparison of the efficiency of classical taxane (paclitaxel) and next-generation Stony Brook Taxanes (SB-Taxanes) in resistant cancer cells
- Molecular mechanism of action of next-generation taxanes in resistant ovarian tumor cells
- Identification of new molecular targets and effect of NOTCH signaling pathway expression profile changes in ovarian carcinoma patients

CONCLUSIONS

- Next-generation taxanes are more efficient against resistant cancer cells than classical taxanes
- Potential candidates for treatment of classical taxane-resistant tumors are especially: SB-T-1216, SB-T-121402, SB-T-121605 and SB-T-121606
- Treatment of taxanes in resistant ovarian tumor cells revealed particular genes and pathways as novel potential targets of therapy (NOTCH, Hedgehog pathways, SLC transporters)
- Study of NOTCH pathway expression profile in ovarian carcinoma patients revealed:
 - Deregulation of NOTCH genes expression in ovarian tumors and association with prognostic factors of ovarian carcinoma

SUBJECTS AND METHODS

Resistant ovarian tumor cells (NCI/ADR-RES): Aim I Cell growth and survival

10⁵ cells/100µl of medium

Cell growth and survival measured after 72 hours of incubation by xCELLigence Real-time Cell Analyzer

Aim III Ovarian carcinoma patients

Trizol RNA tumor extraction (n = 167)

Trizol reagent (Life Technologies)

Reverse transcription

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas)

Aim II Molecular mechanism of taxanes

Changes of gene expression profiles were measured after treatment of resistant ovarian tumor cells with Paclitaxel or SB-T-1216 using Affymetrix U133 Gene Chip Microarrays in biological doubles

Data were analysed using Genespring software (Agilent Technologies v13.1)

mRNA expression using quantitative real-time PCR

Data were analysed using SPSS software (v16.0)

Performed as described (Vaclavikova R, Pharm Genomics 2008; Hlavac V, Pharmacogenomics 2013)

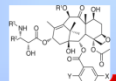
Microarray and RNASeq Experimental Flows



RESULTS

I) The effect of next-generation taxanes on the growth and survival of NCI/ADR-RES cells

Taxane	R ¹	R ²	Substructure	X	Y
Classical taxanes					
Paclitaxel	Ac	Ph	PhCO	H	H
Docetaxel	H	Ph	I-Boc	H	H
Second generation taxanes					
SB-T-1214	c-PhCO	I-butenyl	I-Boc	H	H
SB-T-1216	Me ₂ NCO	I-butenyl	I-Boc	H	H
Third generation taxanes					
SB-T-121602	c-PhCO	I-butenyl	I-Boc	Me	H
SB-T-121603	Me ₂ NCO	I-butenyl	I-Boc	Me	H
SB-T-121605	c-PhCO	I-butenyl	I-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121606	Me ₂ NCO	I-butenyl	I-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121609	c-PhCO	I-butenyl	I-Boc	OCF ₃	H
SB-T-121606	Me ₂ NCO	I-butenyl	I-Boc	OCF ₃	H

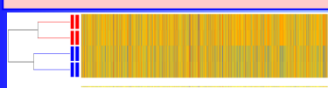


Taxanes and resistant cell line NCI/ADR-RES

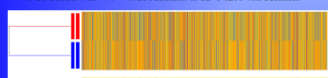
	PCT	SB-T-1214	SB-T-121402	SB-T-121405	SB-T-121406	SB-T-1216	SB-T-121602	SB-T-121605	SB-T-121606
IC ₅₀ [nM]	4000	5	17	191	43	3	38	15	17

The effect of next-generation taxanes on the growth and survival of NCI/ADR-RES cells was higher as compared to that of paclitaxel. Novel taxoids demonstrated higher sensitivity (10-10000-fold) to paclitaxel.

II) Molecular mechanism of taxane action



Condition dataset colors Treatment
NCI-Control-48h vs NCI-Paclitaxel or SB-T-1216-48h treatment



Treatment	Filtered probesets Overall 42645 probes	T-test with FDR of p < 0.05	Fold-change at least 2-fold different	GO categorization	SEA identified pathways (cut-off 0.01)
Control NCI/ADR-RES vs PCT-treated NCI/ADR-RES cells	37326	4112	1661	17 (Biological process 79.11%, Cellular component 20.89%)	53
Control NCI/ADR-RES vs SB-T-1216-treated NCI/ADR-RES cells	37352	9039	3742	7 (Cellular component 70.34%, Biological process 28.72%, Molecular function 2.94%)	57

Gene	Deregulation	Function
IL1B	UP	AHR signaling pathway
NFKB1	UP	AHR signaling pathway
JUND	DOWN	AHR signaling pathway
HES1	DOWN	
CASP3	UP	Apoptosis activation
MORF1_HUMAN	UP	Transport
CASP1	DOWN	Apoptosis activation
NOTCH1	DOWN	NOTCH signaling pathway
NOTCH3	DOWN	NOTCH signaling pathway
NOTCH4	DOWN	NOTCH signaling pathway
SLC1A3	UP	Transport
SLC2A10	DOWN	Transport
SLC5A6	UP	Transport
SLC5A9	DOWN	Transport
SLC5A13	UP	Transport
SLC7A11	DOWN	Transport
SOD2	UP	Destruction of free superoxide radicals

Clusters of significant different gene expression profiles were identified after treatment of resistant ovarian tumor cells with Paclitaxel or SB-T-1216.

III) NOTCH signaling pathway and ovarian carcinoma patients

Deregulation of NOTCH pathway genes were found in ovarian tumors (n=167) in comparison to control tissues (n=17)

Genes	Efficiency of qPCR reaction [%]	p-value	Change of the expression TUMOR vs CONTROL
NOTCH1	104.81	0.077	-
NOTCH2	106.33	0.000	↓
NOTCH3	108.82	0.000	↑
NOTCH4	103.16	0.009	↑
JAG1	95.99	0.505	-
DLG3	94.79	0.006	↓
DL1	95.32	0.920	-
DL4	104.66	0.251	-
HES1	95.27	0.298	-
CNTN1	98.00	0.000	↓

Significant associations of NOTCH pathway gene expression profiles with prognostic factors of ovarian carcinoma were found especially with aggressiveness HGSC type of ovarian tumors

Clinical information	Genes	p-value	Expression change
Tumor grade	NOTCH4	0.045	↓
	JAG1	0.010	↓
	HES1	0.032	↓
	NOTCH1	0.014	↑
	NOTCH4	0.016	↑
HGSC type	JAG1	0.006	↑
	DL1	0.035	↑
	DL4	0.013	↑
	HES1	0.000	↑
	CNTN1	0.009	↑
Disease progression	JAG2	0.025	↓

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by grants of Czech Science Foundation no.: P303/12/G163, AZV no. 15-25618A and USA grant NIH/CA103314.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]